



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

COLONIZAÇÃO NOSOCOMIAL POR BACTÉRIAS DE GRAM NEGATIVO
RESISTENTES PRODUTORAS DE β -LACTAMASES EM CÃES

JOANA ALVES VELOSO DOMINGUES CORREIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro
de Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

CO-ORIENTADOR

Dr^a. Ana Teresa Severino Caldeira
Reisinho

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

COLONIZAÇÃO NOSOCOMIAL POR BACTÉRIAS DE GRAM NEGATIVO
RESISTENTES PRODUTORAS DE β -LACTAMASES EM CÃES

JOANA ALVES VELOSO DOMINGUES CORREIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro
de Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

CO-ORIENTADOR

Dr^a. Ana Teresa Severino Caldeira
Reisinho

2015

LISBOA

Aos meus pais, irmão, avós e namorado.

Agradecimentos

O meu muito obrigada:

À minha orientadora, Professora Doutora Costança Pomba, por toda a sua ajuda, apoio e orientação para a concretização deste trabalho. Desde o momento inicial a sua ajuda foi essencial para a definição do tema desta dissertação, o qual me despertou interesse logo a partir do primeiro momento. À minha co-orientadora, Dr^a. Ana Reinho, por toda a sua ajuda, apoio e por todo o conhecimento transmitido ao longo do meu estágio curricular no Hospital Veterinário Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. O meu estágio curricular foi extremamente enriquecedor graças à sua dedicação e orientação.

Ao Professor Doutor Luís Telo da Gama e ao Professor Doutor Rui Bessa pela ajuda dada relativa à parte estatística. A toda a equipa hospitalar do Hospital Veterinário Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, por toda a ajuda e apoio. Foram muito importantes para o meu crescimento enquanto futura profissional. À equipa do Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas: à Dr^a. Cátia Marques, à Dr^a. Natacha Couto e à Engenheira Adriana Belas, por tudo aquilo que me ensinaram, a sua ajuda foi imprescindível para a concretização deste trabalho. Apesar dos longos dias de trabalho no laboratório, haviam sempre momentos de risos e descontração.

Aos meus pais, Rosa Maria e Helder Jorge, por estarem sempre ao meu lado a apoiar e ajudar-me em tudo. O meu muito obrigada por todo o vosso amor e dedicação desde sempre.

Ao meu irmão Miguel, por estar sempre presente, sei que poderei contar sempre com ele.

Ao meu namorado Paulo Vieira, por todo o seu amor, carinho e alegria que faz iluminar os meus dias. Muito obrigada por seres quem és, por estares sempre ao meu lado, me apoiares sempre e claro pela paciência para os meus momentos menos bons, de dúvidas e medos, mas sei que estarás sempre lá, amo-te.

Aos meus avós, Cidalina e Audénio, por toda a preocupação para que tudo corra sempre pelo melhor e por estarem sempre prontos para me ajudar, muito obrigada.

Ao meu Tio Zé e à minha avó Julieta, sei que este momento a faria muito orgulhosa.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração que fizeram com que o meu percurso fosse bem mais divertido.

Às minhas fiéis amigas de quatro patas, Snooky, Banny, Pompete e Diva, por conseguirem sempre alegrar os meus dias.

Por fim, a todos aqueles que fizeram parte não só do meu percurso académico mas também pessoal, o meu muito obrigada!

RESUMO - COLONIZAÇÃO NOSOCOMIAL POR BACTÉRIAS DE GRAM NEGATIVO RESISTENTES PRODUTORAS DE β -LACTAMASES EM CÃES

Os antibióticos β -lactâmicos são os mais usados, tanto na medicina veterinária como humana. O mecanismo de resistência mais comum a esta classe de antibióticos é a produção de β -lactamases (β -lactamases de espectro alargado - ESBLs, cefalosporinas - AmpCs e carbapenemases) por bactérias de Gram negativo. Os objectivos deste trabalho foram: detectar a presença e quantificar a colonização nosocomial do trato gastrointestinal por bactérias de Gram negativo produtoras de β -lactamases, em cães submetidos a tratamento cirúrgico e identificar quais os factores de risco responsáveis pela colonização e pelo aumento da carga bacteriana. Recolheram-se amostras fecais a 43 cães pertencentes ao grupo de controlo do ambiente (C1ca, n=43) e a 25 cães do grupo de cirurgia: na admissão ao hospital no dia da cirurgia (C1cx, n=25) e após a cirurgia (C2cx, n=22). As recolhas foram realizadas no Hospital Escolar da FMV-ULisboa, entre Fevereiro e Julho de 2014. As amostras foram processadas no Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas (LRAB). Foram isoladas bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (3CG) a partir do meio de MacConkey com 2 μ g/ml de cefotaxima e bactérias resistentes aos carbapenemos a partir do meio de MacConkey com 2 μ g/ml de meropenem. Foram realizados testes fenotípicos (Testes de Susceptibilidade aos Antibacterianos [TSA] pelo método de difusão em disco) e testes genotípicos (*Polymerase Chain Reactions* [PCRs]), de forma a identificar qual o mecanismo de resistência presente nas bactérias isoladas. Nas estirpes resistentes às 3CG, verificou-se um aumento significativo de animais colonizados em C2cx (73%, n=16/22), relativamente a C1cx (P=0,007) e a C1ca (P=0,017). O número de animais colonizados foi também significativamente superior no grupo C1ca (P=0,030) relativamente aos cães em C1cx. As contagens foram significativamente superiores em C2cx comparativamente a C1cx (P=0,004) e a C1ca (P<0,0001), e em C1ca relativamente a C1cx (P=0,0006). Entre os possíveis factores de risco analisados o factor residente (P=0,030) foi o único significativo para o aumento do número de animais colonizados com estirpes resistentes às 3CG e o factor tempo de contacto com a FMV (P=0,001) para o aumento da carga bacteriana. A resistência aos carbapenemos em C1cx foi de 4% (n=1), em C2cx de 23% (n=5) e no grupo C1ca foi de 2% (n=1). As β -lactamases mais prevalentes foram as ESBLs, foram detectadas apenas duas AmpCs plasmídicas e não foram detectadas Carbapenemases. Este trabalho vem reforçar a importância da aplicação de sistemas de controlo de colonização e de infecção nosocomial, para assim melhorar os cuidados de saúde animal e proteger a Saúde Pública.

Palavras-chave: Cães, resistência, β -lactamases, cefalosporinas de 3ª geração, carbapenemos

ABSTRACT – NOSOCOMIAL COLONIZATION BY RESISTANT β -LACTAMASES PRODUCERS GRAM NEGATIVE BACTERIA IN DOGS

β -Lactam antibiotics are the most frequently used both in human and veterinary medicine. The most common resistant mechanism to this class of antibiotics is the production of β -lactamases (Extended Spectrum β -lactamases - ESBLs, Cephalosporinases - AmpCs and Carbapenemases) by Gram negative bacteria. The aim of this study was to detect the presence and quantify nosocomial colonization of the gastrointestinal tract by β -lactamase producing Gram negative bacteria on dogs treated surgically and identify the risks factors responsible for the colonization and the increased bacterial quantification. Fecal samples were collected from 43 dogs belonging to the environmental control group (C1ca, n=43) and 25 dogs from the surgery group: on admission to the hospital before surgery (C1cx, n=25) and after surgery (C2cx, n=22). The samples were collected at the FMV-ULisboa Veterinary Teaching Hospital between January and July 2014. The samples were treated in the FMV-ULisboa Laboratory of Resistance to Antibiotics and Biocids. Bacteria resistant to 3rd generation cephalosporins (3CG) were isolated from MacConkey medium with 2 μ g/ μ l cefotaxime and carbapenem resistant bacteria were isolated from MacConkey medium with 2 μ g/ μ l of meropenem. Phenotypic tests (Antibacterial Susceptibility Testing using the disk diffusion method) and genotypic tests (Polymerase Chain Reactions) were used in order to identify the resistant mechanism in isolated bacteria. There was a significant increase of 3CG resistant strains colonized dogs in C2cx (73%, n=16/22) comparing to C1cx (P=0,007) and C1ca (P=0,017). The number of colonized dogs was also significantly higher in C1ca group (P=0,030) comparing to the C1cx. The bacteria number were significantly higher in C2cx comparing to C1cx(P=0,004) and C1ca group (P<0,0001), and in C1ca group comparing to C1cx (P=0,0006). The resident risk factor was the only one significant (P=0,030) for the increase of colonized animals with 3CG resistant strains and FMV contact time (since when dogs come to FMV) risk factor was the only one significant (P=0,001) for the increased bacterial quantification. The carbapenem resistance bacteria colonization in the dogs of C1cx was 4% (n=1) and in C2cx was 23% (n=5) and in C1ca group was 2% (n=1). The most prevalent β -lactamases were the ESBLs, only two plasmid mediated AmpC were detected and none Carbapenemases. This study enhances the importance of nosocomial colonization and infection control systems, in order to improve animal health and safeguard Public Health.

Keywords: Dogs, resistance, β -lactamases, 3rd generation cephalosporins, carbapenems

Comunicações Científicas

Do trabalho realizado no âmbito desta dissertação de mestrado resultou uma Comunicação Livre no V Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários de 2014:

- Correia, J., Marques, C., Reisinho, A., Couto, N., Belas, A., Bessa, R., Telo da Gama, L. & Pomba, C. (2014). Colonização Nosocomial em Cães por Bactérias de Gram Negativo Produtoras de ESBLs e Carbapenemases. V Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1- Problemática da resistência aos antibacterianos	2
1.2- Antibióticos β -lactâmicos	7
1.3- Resistência aos antibacterianos.....	13
1.3.1- Mecanismos de Resistência	14
1.3.2- Aquisição de Resistência	17
1.3.2.1- Mecanismos genéticos de resistência aos antibacterianos	17
1.4- Classificação das β -lactamases	22
1.4.1- ESBL	24
1.4.2- AmpC	25
1.4.3- Carbapenemases	27
1.5- Colonização nosocomial	29
1.6- Factores de risco	30
1.7- Riscos para a Saúde Pública	32
2- Objectivos.....	34
3- Materiais e Métodos	35
3.1- Processamento das amostras	35
3.2- Identificação bacteriana das bactérias de Gram negativo isoladas	37
3.2.1- Extração de ADN.....	37
3.2.2- Identificação Bacteriana	37
3.3- Identificação fenotípica – susceptibilidade aos antibacterianos	41
3.4- Identificação genotípica	44
3.5- Análise estatística	55
4- Resultados e Discussão	57
4.1- Colonização por bactérias resistentes às cefalosporinas de 3 ^a geração	58
4.2- Colonização por bactérias resistentes aos carbapenemos	61
4.3 – Quantificação da colonização por bactérias resistentes às cefalosporinas de 3 ^a geração e carbapenemos	63
4.4- Resultados obtidos em ambos os grupos quanto às bactérias resistentes às cefalosporinas de 3 ^a geração e aos carbapenemos	65
4.4.1- Identificação do género/espécie de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3 ^a geração e carbapenemos	68

4.4.2- Determinação Filogrupos de <i>E. coli</i>	68
4.4.3- Determinação da susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos	70
4.4.4- Determinação do mecanismo molecular de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.....	71
4.4.5- Fenótipo e genótipo de estirpes resistentes aos antibióticos β -lactâmicos	72
4.4.6- Factores de risco responsáveis pela colonização e pelo aumento da carga de bactérias de Gram negativo resistentes	78
5- Conclusão.....	83
6- Bibliografia.....	85
Anexo I - Actividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular no Hospital Veterinário Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, entre Fevereiro e Julho de 2014.....	93
Anexo II – Questionário feito para os cães de ambos os grupos (grupo de controlo do ambiente e grupo de cirurgia).....	98
Anexo III – Questionário feito apenas para os cães do grupo de cirurgia.....	99
Anexo IV – Respostas ao questionário feito para os cães de ambos os grupos, relativas aos cães pertencentes ao grupo de controlo do ambiente.	100
Anexo V – Respostas ao questionário feito para os cães de ambos os grupos, relativas aos cães pertencentes ao grupo de cirurgia.	103
Anexo VI – Respostas ao questionário feito apenas para os cães do grupo de cirurgia.....	105
Anexo VII – Resultados dos testes de susceptibilidade a antibacterianos das estirpes resistentes às cefalosporinas de 3 ^a geração e aos carbapenemos isoladas no grupo de controlo do ambiente.	107
Anexo VIII – Resultado do testes de susceptibilidade a antibacterianos da estirpes resistentes às cefalosporinas de 3 ^a geração e aos carbapenemos isoladas no grupo de cirurgia.	109
Anexo IX – Gráficos complementares	111

Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição de vendas de agentes antibacterianos veterinários para animais de companhia em 2012 (adaptado de EMA, 2014).	3
Figura 2 - Distribuição de vendas do agente antibacteriano penicilina associado ou não com um inibidor de β -lactamases (adaptado EMA, 2014).	4
Figura 3 - Representação da parede celular numa bactéria de Gram negativo e numa bactéria de Gram positivo (adaptado de <i>Eberly College of Science</i> , 2014).	9
Figura 4 - Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos para a classificação dos antibacterianos bactericidas em (1) concentração dependentes e (2) tempo dependentes (adaptado de Grgurich, Hudcova, Lei, Sarwar & Craven, 2012).	10
Figura 5 - Divisão dos grupos de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Oliveira, Granato, Hirata, Hokka & Barboza, 2009).	11
Figura 6 - Actividade antibacteriana das cefalosporinas (adaptado de Greene & Boothe, 2012).	12
Figura 7 - Principais mecanismos de resistência aos antibacterianos: 1) produção de enzimas capazes de destruir os antibacterianos, 2) a expressão de sistemas de efluxo que impedem o antibacteriano de atingir o seu alvo intracelular, 3) modificação do local de acção do antibacteriano e 4) alteração da permeabilidade da membrana externa (adaptado de Périchon & Courvalin, 2009).	14
Figura 8 - Plasmídeos - elementos genéticos encontrados em células bacterianas (adaptado de Moreira & Mendes, 1998).	18
Figura 9 - Estratégias de replicação de plasmídeos não integrativos (a) e integrativos ou episomas (b) (adaptado de Moreira & Mendes, 1998).	19
Figura 10 - Transferência de plasmídeos por conjugação entre células bacterianas (adaptado de Moreira & Mendes, 1998).	20
Figura 11 - Esquema de um integrão da classe I (adaptado de Bennett, 2008).	21
Figura 12 - Captura da cassette genética por um integrão bacteriano (adaptado de Bennett, 2008).	22
Figura 13- Aspecto morfológico de bactérias de Gram negativo em meio de agar MacConkey: bactérias fermentadoras da lactose da espécie <i>E. coli</i> (esquerda) e bactérias não fermentadoras da lactose (direita).	38
Figura 14 - Alteração da cor do meio Mueller Hinton (para verde), indicativo da presença de bactérias do género <i>Pseudomonas</i> spp.	38
Figura 15 - Chave dicotómica para determinar o grupo filogenético da espécie <i>E. coli</i> , através do resultado da amplificação dos genes <i>chuA</i> e <i>yjaA</i> e o fragmento de ADN TSPE4.C2 (Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000).	39
Figura 16 - Teste da oxidase: resultado positivo (tira esquerda) e resultado negativo (tira direita).	41
Figura 17 - Quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima) no grupo de cirurgia antes da cirurgia (C1cx, 6 cães colonizados em 25), no grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx, 16 cães colonizados em 22) e no grupo de controlo do ambiente (C1ca, 18 cães colonizados em 43).	64

Figura 18 - Observação de sinergias pelo DDST, entre os discos de cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico, em placas de agar Mueller Hinton.....	70
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Sequência genómica dos <i>primers</i> GADA, CHUA, YJAA e TSPE4.C2 <i>forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R) utilizados no PCR para identificação dos isolados suspeitos de <i>E. coli</i> segundo Doumith et al. (2012).	40
Tabela 2 - Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos para Enterobacteriaceae (CLSI, 2014). Critérios usados para as estirpes isoladas dos meios com cefotaxima e meropenem.	43
Tabela 3 - Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CLSI, 2014). Critérios usados para as estirpes isoladas dos meios com cefotaxima e meropenem.	43
Tabela 4 - Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos para <i>Burkholderia cepacia</i> (CLSI, 2014). Critérios usados para as estirpes isoladas dos meios com cefotaxima e meropenem.	44
Tabela 5 - Lista de <i>primers</i> utilizados no PCR <i>multiplex</i> β -lactamases (Pomba et al., 2006) e no PCR CTX-M (Eldestein et al., 2003).	46
Tabela 6 - Lista de <i>primers</i> utilizados nas reacções de PCR CTX-M <i>simplex</i> para os vários grupos testados (Woodford et al., 2005).	50
Tabela 7 - Lista de <i>primers</i> utilizados na reacção de PCR <i>multiplex</i> AmpC (Pérez-Pérez & Hanson, 2002).	51
Tabela 8 - Lista de <i>primers</i> utilizados no PCR <i>multiplex</i> para detecção de Carbapenemases (Poirel et al., 2011).	54
Tabela 9 - Bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração - resultados obtidos em ambos os grupos, quanto à classificação, filogenia <i>E. coli</i> , padrão de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sinergia positiva e genes de resistência detectados.	65
Tabela 10 - Bactérias resistentes aos carbapenemos - resultados obtidos em ambos os grupos, quanto à oxidade, classificação, identificação (Api 20NE e Api 20E), padrão de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sinergia positiva e genes de resistência detectados.	67
Tabela 11 - Classificação, perfil de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sinergia positiva e genes detectados em C1cx e em C2cx (estirpes produtoras de ESBL, β -lactamase TEM e β -lactamase BS OXA-1).	72
Tabela 12 - Classificação, perfil de resistência, sinergia positiva e genes detectados de estirpes pertencentes ao grupo C2cx, concretamente estirpes produtoras de TEM e/ou de OXA-1 e simultaneamente portadoras de outro mecanismo de resistência, e estirpes pertencentes ao grupo C1ca, concretamente estirpes produtoras de ESBLs simultaneamente de TEM e de outro mecanismo de resistência não identificado.	75
Tabela 13 - Estirpes isoladas da espécie <i>E. coli</i> produtoras de AmpCs plasmídicas do tipo CMY-2 no grupo C1ca.	76
Tabela 14 - Antibiograma e o provável mecanismo implicado na resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos carbapenemos (Grosso, 2014), juntamente com o padrão fenotípico das estirpes identificadas como <i>P. aeruginosa</i>	78
Tabela 15 - Factores de risco e os correspondentes <i>Odds Ratio</i> (OR), Intervalo de Confiança (IC) e valores de P para a ocorrência colonização com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, a partir de regressão logística (C1ca n=43 cães; C1cx n=25 cães; C2cx n=22 cães).	79

Tabela 16 - Factores de risco e os correspondentes valores de P para o aumento da quantidade de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3 ^a geração, a partir do procedimento GLM (C1ca n=43 cães; C2cx n=22 cães).....	82
---	----

Índice de Gráficos:

Gráfico 1- Protocolo laboratorial de isolamento de bactérias de Gram negativo produtoras de β -lactamases (ESBL, AmpC e Carbapenemases) a partir de amostras fecais de cão.....	36
Gráfico 2 - Protocolo laboratorial para a quantificação de bactérias de Gram negativo produtoras de β -lactamases (ESBL, AmpC e Carbapenemases) a partir de amostras fecais de cão.....	36
Gráfico 3 - Dia de recolha da amostra fecal no grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx, n=22).	57
Gráfico 4 - Cães colonizados com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima).....	58
Gráfico 5 - Cães colonizados com bactérias resistentes aos carbapenemos (meropenem).	62

Abreviaturas

ADN / DNA – Ácido desoxirribonucleico / “Desoxyribonucleic acid”

AMC – Amoxicilina/Ácido Clavulânico

AMP – Ampicilina

AmpC - Cefalosporinas

ATM - Aztreonam

ATP – Adenosina Trifosfato

AUC – “Area Under the Curve”

BS – “Broad Spectrum”/ Largo Espectro

CAZ - Ceftazidima

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CLSI – “Clinical and Laboratorial Standards Institute”

CS – “Conserved Sequences”

CTX - Cefotaxima

C1ca - Grupo de Controlo do Ambiente

C1cx – Grupo de Cirurgia Antes da Cirurgia

C2cx – Grupo de Cirurgia Após a Cirurgia

DDST – “Double-Disk Synergy Test”

dNTP – “Deoxynucleotide triphosphates” / Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acídico

EMA – “European Medicines Agency”

ESBL - “Extended Spectrum Beta-lactamases” / Beta-lactamases de Espectro Alargado

ETP - Ertapenem

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

FOX - Cefoxitina

g - Grama

IMP - Imipenem

Kb – Kilo Pares de Bases

KF - Cefalotina

LPS – Lipopolissacarídeos

LRAB – Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas

MEM - Meropenem

MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* metilina-resistentes)

MRSP - methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (*Staphylococcus pseudintermedius* metilina-resistentes)

ml - Mililitro

mM - Milimol

OIE – “World Organisation for Animals Health”

Pb – Pares de bases

PBPs – “Penicillin-Binding Proteins”

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

pmol - Picomole

SI – Sequências de Inserção

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TGI – Trato Gastrointestinal

TSA – Teste de Susceptibilidade aos Antibacterianos

TZP – Piperacilina/Tazobactam

U – Unidade de Actividade Enzimática

UFC – Unidade Formadora de Colónia

ULisboa – Universidade de Lisboa

WHO – “World Health Organization”

µg – Micrograma

µl - Microlitro

1. Introdução

A resistência aos agentes antibacterianos é um tema de importância crescente na Saúde Humana e Animal. Inicialmente os microrganismos resistentes aos antibacterianos estavam associados a instituições de cuidados humanos, contudo actualmente são encontrados cada vez mais na comunidade e em animais de produção, o que sugere a troca de microrganismos ou genes entre diferentes reservatórios ou uma diferente utilização dos antibacterianos (Dierikx et al., 2012). Muitos estudos têm vindo a demonstrar que os antibacterianos usados nos animais de produção contribuem para a selecção de resistências antibacterianas, colocando em risco os seres humanos devido à possível transmissão de bactérias zoonóticas resistentes através da cadeia alimentar. Para além desta forma de transmissão, os humanos podem adquirir bactérias resistentes através do contacto directo entre pessoas, com animais e com o meio ambiente (Guardabassi, Schwarz & Lloyd, 2004).

O número de animais de companhia na sociedade moderna está a aumentar e a relação entre estes e o homem tem sofrido algumas mudanças. O contacto entre o homem e os seus animais de companhia é cada vez mais próximo, o que conduz a uma crescente preocupação pelo seu bem estar e, inevitavelmente, ao aumento dos gastos no veterinário, tanto na terapêutica como na prevenção de doenças. Uma das principais consequências é o uso frequente de agentes antibacterianos, incluindo agentes antibacterianos de uso humano. Contrariamente à clínica de animais de produção, o clínico de animais de companhia muitas vezes dispõe de um maior leque de opções terapêuticas, o que pode resultar na prescrição indiscriminada de antibacterianos, especialmente nos casos mais complicados, quando o diagnóstico não é conhecido. Nestas alturas, são muitas vezes prescritos antibacterianos devido ao possível risco de ocorrência de infecções secundárias, sendo a selecção do antibacteriano feita empiricamente, o que por vezes resulta da pressão exercida pelos proprietários. A selecção empírica do tratamento por vezes é inadequada, uma vez que a bactéria em causa não é identificada (Guardabassi et al., 2004). Assim, o contacto próximo entre os humanos e os animais pode resultar no risco de transferência de bactérias, nomeadamente de bactérias resistentes (Wedley et al., 2011).

Nos hospitais veterinários, as infecções adquiridas durante a hospitalização, isto é, as infecções nosocomiais, causadas por bactérias resistentes são um problema emergente, embora aparentemente, menos prevalente e menos grave que o que tem sido relatado nos hospitais humanos. As bactérias mais frequentemente implicados nos hospitais veterinários

são: *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* e *Pseudomonas* spp. (Maddison, Watson & Elliott, 2008).

A emergência de bactérias resistentes como as bactérias produtoras de β -lactamases e outras, como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes ou *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina-resistentes, tanto em animais saudáveis como doentes, traduz o potencial risco de transmissão de bactérias resistentes para os humanos a partir dos animais de companhia (European Medicines Agency [EMA], 2013).

1.1- Problemática da resistência aos antibacterianos

A resistência aos antibacterianos tem vindo a tornar-se um problema preocupante de saúde pública a nível global. A magnitude deste problema pode ser ilustrada pelo facto de que mais de 25.000 pessoas na União Europeia morrerem por ano com infecções causadas por bactérias resistentes aos antibacterianos (World Health Organization [WHO], 2012).

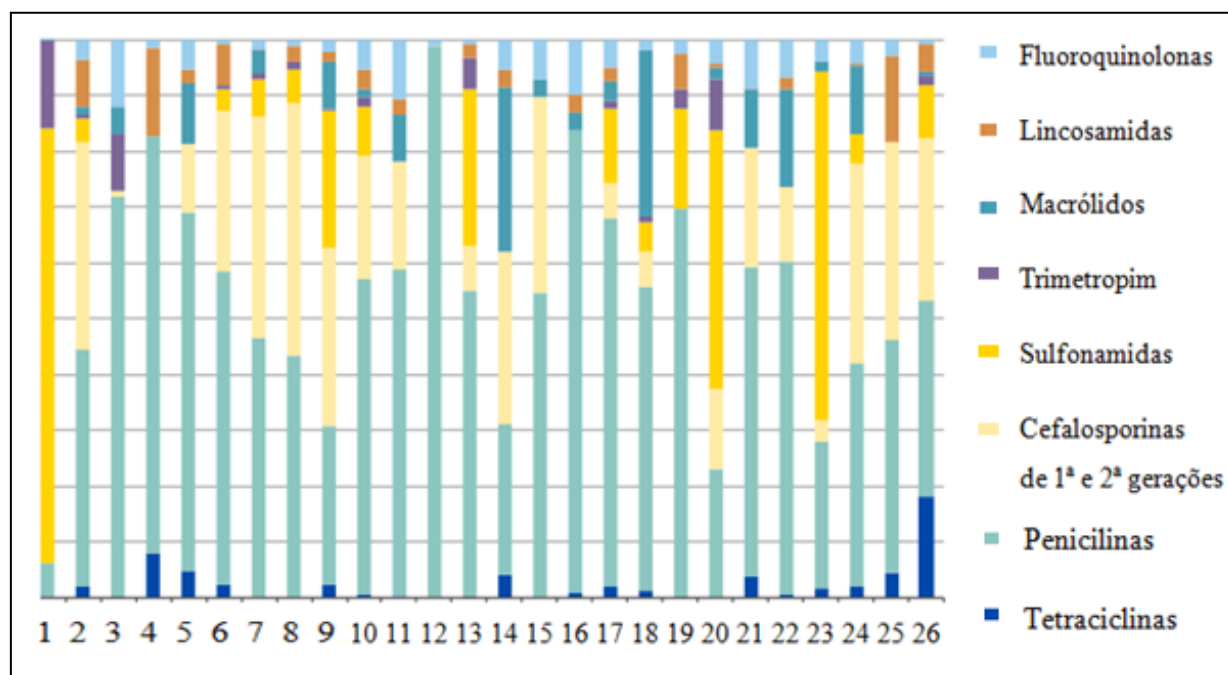
Estudos realizados têm demonstrado que o aumento mundial de resistência aos antibacterianos apresenta um comportamento paralelo ao uso de medicamentos no tratamento de infecções microbianas em humanos e animais (Greene & Boothe, 2012).

A crescente utilização de antibacterianos, com fins terapêuticos e profiláticos, nos animais de companhia, assim como o uso generalizado de antibacterianos de largo espectro, são descritos como os principais responsáveis pelo aumento evidente de padrões de resistência a microrganismos infecciosos (EMA, 2014; Greene & Boothe, 2012).

Para combater o problema da resistência antibacteriana é necessário adoptar uma abordagem intersectorial, global e multifacetada, assim como uma eficaz coordenação de acção e troca de informações entre os sectores agrícola, alimentar, veterinário e sanitário (WHO, 2012).

As classes de antibacterianos mais frequentemente usadas na clínica de animais de companhia estão representadas na Figura 1.

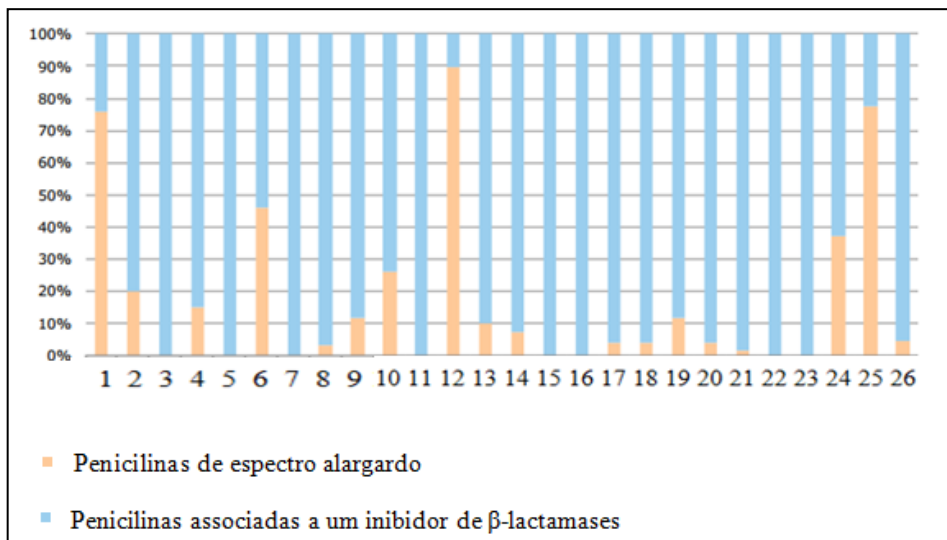
Figura 1 - Distribuição de vendas de agentes antibacterianos veterinários para animais de companhia em 2012 (adaptado de EMA, 2014).



Legenda: 1 – Áustria, 2 – Bélgica, 3 – Bulgária, 4 – Chipre, 5 – República Checa, 6 – Dinamarca, 7 – Estónia, 8 – Finlândia, 9 – França, 10 – Alemanha, 11 – Hungria, 12 – Islândia, 13 – Irlanda, 14 – Itália, 15 – Letónia, 16 – Lituânia, 17 – Luxemburgo, 18 – Países Baixos, 19 – Noruega, 20 – Polónia, 21 – Portugal, 22 – Eslováquia, 23 – Eslovénia, 24 – Espanha, 25 – Suécia, 26 – Reino Unido.

A Figura 1 ilustra a distribuição de vendas de comprimidos (em toneladas de ingrediente activo), por classe de antibacterianos e por país, no ano de 2012. Este gráfico agrega 26 países, sendo as penicilinas (35%), as cefalosporinas de 1ª e 2ª geração (27%), as sulfonamidas (13%) e os macrólidos (7%) as classes de antibacterianos mais vendidas. Assim, para a maioria dos países, as penicilinas, principalmente em combinação com inibidores de β -lactamases (Figura 2), foram os agentes antibacterianos veterinários mais vendidos (EMA, 2014).

Figura 2 - Distribuição de vendas do agente antibacteriano penicilina associado ou não com um inibidor de β -lactamases (adaptado EMA, 2014).



Legenda: 1 – Áustria, 2 – Bélgica, 3 – Bulgária, 4 – Chipre, 5 – República Checa, 6 – Dinamarca, 7 – Estónia, 8 – Finlândia, 9 – França, 10 – Alemanha, 11 – Hungria, 12 – Islândia, 13 – Irlanda, 14 – Itália, 15 – Letónia, 16 – Lituânia, 17 – Luxemburgo, 18 – Países Baixos, 19 – Noruega, 20 – Polónia, 21 – Portugal, 22 – Eslováquia, 23 – Eslovénia, 24 – Espanha, 25 – Suécia, 26 – Reino Unido.

Os dados correspondentes ao consumo de antibacterianos nos animais de companhia estão muitas vezes incompletos pois geralmente referem-se apenas às vendas nos fornecedores (EMA, 2014). Embora os dados de vendas dos fornecedores dêem uma estimativa da magnitude do consumo de agentes antibacterianos, geralmente não contêm certos dados sobre a sua utilização, como por exemplo dados que indiquem o seu uso nas diferentes espécies, o que consequentemente impede a monitorização da utilização de agentes antibacterianos nas diferentes espécies (EMA, 2014). Outra questão é a utilização de agentes antibacterianos de uso humano em animais de companhia, assim como noutras espécies (animais de produção), sendo este consumo de antibacterianos não contabilizado. Este facto é bastante preocupante, dada a regularidade com que são usados antibacterianos. Certos países, como o Reino Unido, já implementaram sistemas de vigilância, os quais permitem monitorizar a utilização de antibacterianos nos animais de companhia. Os dados recolhidos permitem não só monitorizar as prescrições, como também fornecem uma importante visão sobre os padrões e tendências de uso de antibacterianos, assim como dos problemas mais comuns nos animais de companhia (EMA, 2014).

O uso profilático de antibióticos, de forma a evitar antecipadamente a ocorrência de infecções, é controverso. Este facto deve-se ao aumento do risco de selecção de microrganismos resistentes, pois o uso indiscriminado de antibacterianos altera a microbiota do paciente e pode assim permitir a colonização com bactérias resistentes. As pressões de selecção são mais elevadas quando as bactérias são expostas a doses sub-óptimas, isto é, a concentrações inferiores à concentração mínima inibitória (CMI). No entanto, em certos casos, a administração profilática tem sido descrita como benéfica. Esses casos incluem feridas contaminadas após o trauma, procedimentos cirúrgicos nos quais a contaminação é esperada, procedimentos cirúrgicos realizados em pacientes imunodeprimidos e em procedimentos cirúrgicos prolongados, nos quais a exposição prolongada do tecido saudável ao ar é esperada. Os antibacterianos também podem ser indicados profilaticamente antes de um procedimento odontológico e em cirurgias realizadas em pacientes considerados de alto risco, isto é, pacientes com diabetes mellitus, hiperadrenocorticism, neoplasias e doença broncopulmonar crónica. Desta forma, é essencial que os centros de atendimento veterinário desenvolvam protocolos que minimizem o inadequado e indiscriminado uso de antibacterianos (Greene & Boothe, 2012).

Um estudo realizado em Itália revelou que apenas 5% das prescrições de antibacterianos, realizadas num Hospital Escolar Veterinário, foram suportadas por exames laboratoriais, como cultura bacteriana e testes de susceptibilidade aos antibacterianos (TSA) (EMA, 2013). Nos Estados Unidos, num Hospital Veterinário Universitário de referência, um estudo realizado em 2009 numa unidade de cuidados intensivos de cães, reportou que as escolhas de antibacterianos foram as apropriadas em apenas 19% dos pacientes internados (EMA, 2013). Em 2012, foi realizado um estudo no Reino Unido sobre os padrões de prescrição de antibacterianos, o qual demonstrou que cerca de 2% das receitas para cães e gatos eram de produtos não autorizados para essas espécies. Por estas razões, alguns países têm vindo a desenvolver guias nacionais de prescrição para a clínica de animais de companhia (EMA, 2013).

A *World Organisation for Animal Health* (OIE) publicou em Fevereiro de 2014 uma lista de agentes antibacterianos de importância veterinária, de forma a promover o controlo da antibiorresistência. Esta lista veio actualizar a lista de 2013, na medida em que tem em consideração questões referentes à saúde humana, sendo o principal objectivo desta lista salvaguardar a eficácia e a disponibilidade dos agentes antibacterianos veterinários, para as doenças onde existem poucas ou nenhuma alternativas antibacterianas.

Trata-se de uma ferramenta muito importante para os clínicos veterinários, ajudando-os nas suas escolhas terapêuticas. Os antibacterianos estão agrupados em três categorias: Agentes Antibacterianos Veterinários Criticamente Importantes, Agentes Antibacterianos Veterinários Extremamente Importantes e Agentes Antibacterianos Veterinários Importantes (OIE, 2014).

No que diz respeito aos antibióticos β -lactâmicos veterinários, estes foram classificados da seguinte forma (OIE, 2014):

- Agentes Antibacterianos Veterinários Criticamente Importantes: penicilinas e cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações.
- Agentes Antimicrobianos Veterinários Extremamente Importantes: cefalosporinas de 1^a e 2^a gerações.

A WHO publicou em 2012, a lista dos antibacterianos criticamente importantes para medicina humana, a qual deve ser usada como referência para ajudar a formular e a priorizar estratégias de avaliação e de gestão de risco para controlar a resistência antibacteriana, devido ao uso humano e veterinário de antibacterianos. Este documento destina-se a autoridades de saúde pública e de sanidade animal, médicos de medicina humana e de medicina veterinária e todos aqueles que se encontram envolvidos no controlo da resistência antibacteriana, para assim garantir que os antibacterianos criticamente importantes são utilizados com prudência, tanto na medicina humana como na medicina veterinária. De especial importância são as fluoroquinolonas, as cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações, os macrólidos e os glicopeptídeos, pois têm sido classificados como sendo de alta prioridade no que diz respeito ao controlo do risco de resistência antibacteriana (WHO, 2012). Os carbapenemos actualmente não têm equivalente em medicina veterinária. A WHO (2012) recomenda que esta classe, bem como qualquer nova classe de antibacterianos desenvolvida para terapêutica humana, não seja utilizada em animais.

Com base em alguns critérios, são consideradas três categorias de importância para a medicina humana: Criticamente Importante, Extremamente Importante e Importante (WHO, 2012).

Quanto aos antibióticos β -lactâmicos, estes são agrupados da seguinte maneira (WHO, 2012):

- Categoria Criticamente Importante: carbapenemos, cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações, monobactams e penicilinas.
- Categoria Extremamente Importante: cefalosporinas de 1^a e 2^a gerações, cefamicinas e penicilinas (anti-estafilocócicas).

Vários estudos realizados indicam uma possível associação entre o uso de antibacterianos e a emergência de resistência antibacteriana em animais de companhia (Belas, Salazar, Gama, Couto & Pomba, 2014; Wedley et al., 2011).

Assim sendo, a resistência antibacteriana corresponde a um problema comum de ambas as medicinas, humana e veterinária, pode conduzir à falha do tratamento, ao aumento da morbilidade e da mortalidade e ao aumento dos gastos financeiros nos serviços de saúde prestados (Wedley et al., 2011). Importa referir o conceito de *One Health*, ou seja, a saúde humana, animal, assim como a saúde do ecossistemas estão intimamente ligadas. Não se trata de um conceito novo, mas nos últimos anos tem se tornado cada vez mais importante, pois as interações entre os seres humanos, animais e meio ambiente têm vindo a sofrer alterações, as quais têm provocado a emergência e reemergência de muitas doenças (One Health initiative; Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Desta forma, o uso racional dos agentes antibacterianos permitirá controlar a emergência de bactérias resistentes e assim preservar os antibacterianos disponíveis (Tafur, Torres & Villegas, 2008).

1.2- Antibióticos β -lactâmicos

Os antibacterianos são substâncias químicas que impedem o crescimento de microrganismos, ou podem eventualmente destruí-los, e são produzidos através da fermentação natural ou através da síntese química. Designam-se por antibióticos aqueles que provêm de substâncias produzidas por várias espécies microbianas (bactérias, fungos, actinomicetes), mas nem todos os agentes antibacterianos são antibióticos, alguns são produzidos unicamente por síntese química, como por exemplo as sulfonamidas e as fluoroquinolonas (Maddison et al., 2008).

A "idade de ouro" chegou em 1941 com a produção e o uso clínico da penicilina. Assim, muitas infecções bacterianas, anteriormente fatais, podiam agora ser tratadas com sucesso, mas o uso generalizado de agentes antibacterianos tem resultado em problemas substanciais, como o aparecimento e a disseminação de agentes patogénicos resistentes e o aumento dos custos nos cuidados de saúde, os quais se devem à necessidade de desenvolver novos antibacterianos capazes de neutralizar as bactérias resistentes (Maddison et al., 2008).

O objectivo da terapêutica antibacteriana é ajudar o corpo na eliminação de microrganismos infecciosos, sem efeitos tóxicos para o hospedeiro. É importante reconhecer que os mecanismos naturais de defesa do paciente são primariamente importantes na prevenção e no controlo da infecção.

Alguns exemplos de mecanismos de defesa naturais são: o sistema mucociliar nas vias respiratórias, o efeito de esvaziamento da micção e a microbiota normal do trato gastrointestinal (Maddison et al., 2008).

Após ocorrer a invasão microbiana, são despoletadas várias respostas no hospedeiro de forma a eliminar os organismos invasores, as quais incluem: uma resposta inflamatória, a migração celular e fagocitose, o sistema complemento e a produção de anticorpos (Maddison et al., 2008).

A dificuldade de controlar infecções em pacientes imunodeprimidos realça o facto de que a terapêutica antibacteriana é mais eficaz quando actua juntamente com os mecanismos de defesa endógenos do que quando actua como o único meio de controlo (Maddison et al., 2008).

Os antibacterianos são agrupados em classes ou famílias com base na sua estrutura química, desta forma os membros de uma determinada classe estão intimamente relacionados. Assim, os antibacterianos da mesma classe actuam, geralmente, sobre o mesmo compartimento celular e, consequentemente, são substratos-alvo do mesmo mecanismo de resistência. Por esta razão, o raciocínio em termos de resistência implica uma avaliação ao nível das classes de antibacterianos e não de uma avaliação individualizada de cada agente (Périchon & Courvalin, 2009).

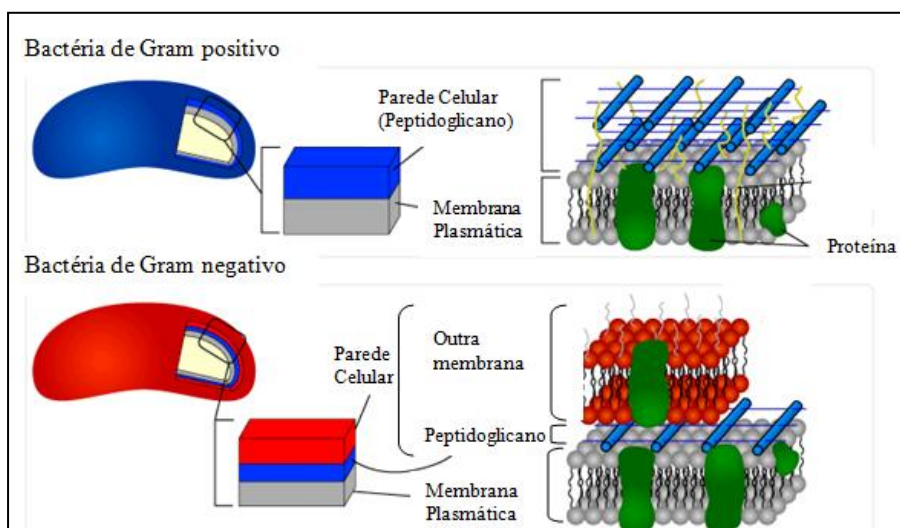
Existem cinco principais mecanismos de acção dos antibacterianos a nível celular: interferência com a síntese da parede da bactéria (β -lactâmicos, glicopéptideos), inibição da síntese proteica (tetraciclina e macrólidos), interferência com a síntese de ácidos nucleicos (quinolonas e rifampina), inibição de uma via metabólica (trimetoprim-sulfametoxazol) e pela ruptura estrutural da membrana bacteriana (polimixinas) (Tenover, 2006; Périchon & Courvalin, 2009).

A parede celular protege os seres procariotas do meio ambiente e de fenómenos de osmólise e é caracterizada pela presença de peptidoglicano. O peptidoglicano localiza-se na face externa da membrana citoplasmática, é responsável pela rigidez da parede celular e pela determinação da forma da célula (Périchon & Courvalin, 2009).

Os antibióticos β -lactâmicos actuam através da interrupção da síntese da parede celular bacteriana afectando a sua integridade, o que conduz à lise celular. Esta classe de antibióticos tem a capacidade de bloquear a transpeptidação, processo responsável pela síntese da parede celular, através da sua ligação às transpeptidases, também denominadas proteínas de ligação às penicilinas (*penicillin-binding proteins* [PBPs]). Estes antibióticos são mais eficazes quando se tratam de microrganismos com elevado índice de multiplicação, devido à elevada taxa de formação da parede celular (Périchon & Courvalin, 2009).

Nas bactérias de Gram negativo a camada de peptidoglicano é pouco abundante e situa-se entre a membrana plasmática e a membrana externa da parede celular, enquanto nas bactérias de Gram positivo o peptidoglicano tem uma espessura superior, no entanto a parede celular destas bactérias não possui membrana externa (Figura 3) (Périchon & Courvalin, 2009).

Figura 3 - Representação da parede celular numa bactéria de Gram negativo e numa bactéria de Gram positivo (adaptado de *Eberly College of Science*, 2014).



Os agentes antibacterianos são frequentemente descritos como bacteriostáticos ou bactericidas. Os fármacos bacteriostáticos (cloranfenicol, lincosamidas, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprim) inibem temporariamente a multiplicação de organismos, mas o efeito é reversível assim que o fármaco é removido. Para que estes fármacos sejam clinicamente eficazes, a sua concentração no local da infecção deve ser mantida acima da CMI, ao longo do intervalo de dosagem. Muitos fármacos bacteriostáticos podem tornar-se bactericidas se o tempo de exposição a estes for suficientemente prolongado (Maddison et al., 2008).

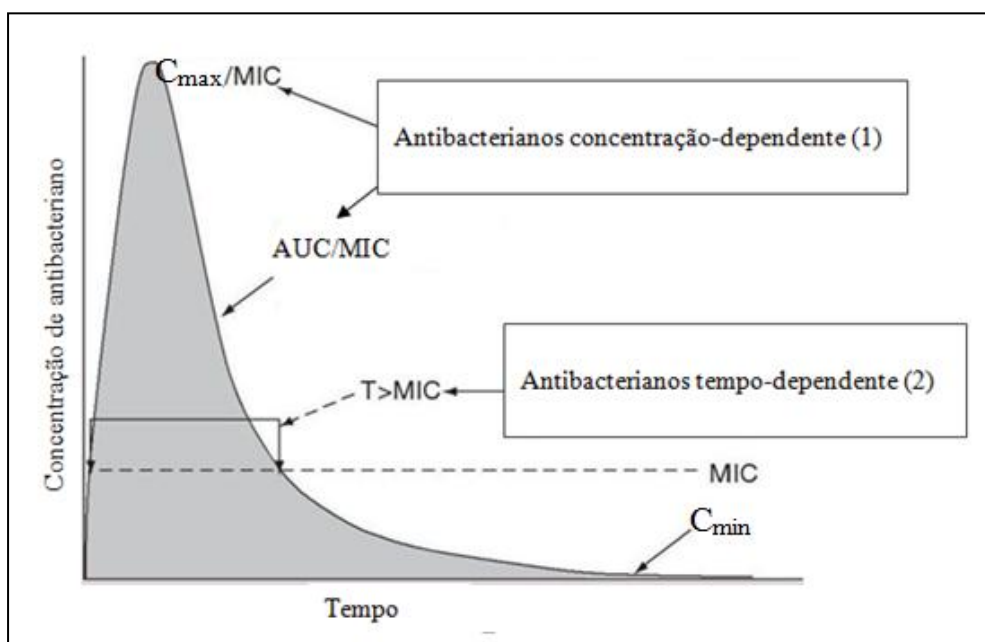
Os agentes bactericidas (aminoglicosídeos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, metronidazol, penicilinas, sulfonamidas potenciadas) têm a capacidade de causar a morte do microrganismo. Estes fármacos são preferencialmente usados em infecções nas quais o hospedeiro não tem a capacidade de controlar ou erradicar a infecção através de mecanismos endógenos, devido à natureza ou ao local da infecção, ou devido à diminuição da sua resposta imunitária, como no caso de um paciente com doença imunossupressora (Maddison et al., 2008). Os antibacterianos podem ser divididos em dois grupos com base nos seus padrões de actividade bactericida: antibacterianos concentração dependentes e antibacterianos tempo dependentes (Figura 4).

Os antibacterianos concentração dependentes alcançam a sua actividade óptima no momento em que atingem a sua concentração máxima, relativamente à CMI para o microrganismo em causa. Este grupo inclui os aminoglicosídeos e as quinolonas. A eficácia das quinolonas está também associada com a área sob a curva (*Area Under the Curve* [AUC]).

A acção destes antibacterianos é maximizada e simultaneamente reduzida a quantidade de bactérias resistentes induzidas, se a sua administração for feita por infusão de *bolus* ou numa única dose diária (Greene & Boothe, 2012).

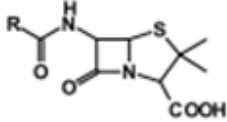
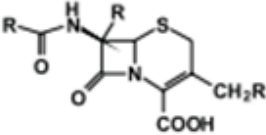
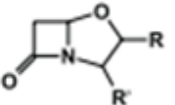
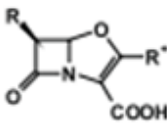
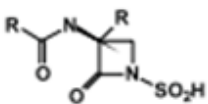
Os restantes agentes antibacterianos são tempo dependentes. Os antibacterianos pertencentes a este grupo apresentam uma actividade óptima quando as concentrações plasmáticas atingem cerca de quatro vezes a CMI e assim devem ser mantidas durante 50 a 80% do intervalo de dosagem. Os antibacterianos pertencentes a este grupo são os β -lactâmicos, a vancomicina, as tetraciclina, os fenicóis, a clindamicina e a maioria dos macrólidos. A eficácia das tetraciclina, macrólidos e vancomicina está também relacionada com a AUC. A administração destes antibacterianos através de infusão contínua ou em múltiplas doses diárias seria mais eficaz, pois tratam-se de medicamentos com tempos de semi-vida curtos (Greene & Boothe, 2012).

Figura 4 - Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos para a classificação dos antibacterianos bactericidas em (1) concentração dependentes e (2) tempo dependentes (adaptado de Grgurich, Hudcova, Lei, Sarwar & Craven, 2012).



Os antibióticos β -lactâmicos incluem as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenemos, os monobactams e os inibidores das β -lactamases (Figura 5) (Greene & Boothe, 2012).

Figura 5 - Divisão dos grupos de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Oliveira, Granato, Hirata, Hokka & Barboza, 2009).

Estrutura Química	Antibióticos	Microrganismos produtores
	Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Cefalosporinas Cefamicinas	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Nocardia lactamdurans</i>
	Acido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Carbapenemos	<i>Streptomyces cattleya</i> <i>Streptomyces olivaceus</i>
	Monobactams	<i>Glunobacter sp.</i> <i>Pseudomonas acidophila</i> <i>Acetobacter sp.</i>

O grupo das penicilinas inclui as penicilinas naturais (penicilina G e V), as quais não têm acção sobre bactérias de Gram negativo, as penicilinas β -lactamases resistentes, também sem acção sobre Gram negativos. Incluem ainda as aminopenicilinas (amoxicilina e ampicilina), as quais apresentam uma capacidade de inibição variável, as carboxipenicilinas, que dispõem de um espectro de acção mais alargado e por isso um maior poder de inibição, no entanto são degradadas pelas β -lactamases, e por fim as ureidopenicilinas (piperacilin), igualmente não resistentes às β -lactamases, mas apresentam um maior poder inibitório sobre as bactérias de Gram negativo (Greene & Boothe, 2012).

As cefalosporinas são semelhantes às penicilinas, mas mais eficazes pois têm uma maior capacidade de penetrar na parede celular das bactérias de Gram negativo e são menos susceptíveis à inativação por β -lactamases.

Este grupo de antibióticos foi separado em quatro gerações (Figura 6) com base na cronologia da descoberta, na estrutura química e na actividade terapêutica. Geralmente, as gerações crescentes estão associadas com a sensibilidade diminuída à degradação pelas β -lactamases, no entanto o surgimento de β -lactamases mais potentes veio afectar esta distinção. Este grupo inclui as cefamicinas (cefotaxima e cefotetan), o carbacefem (loracarbef) e o oxacefem (latamoxef) (Greene & Boothe, 2012).

Figura 6 - Actividade antibacteriana das cefalosporinas (adaptado de Greene & Boothe, 2012).

Geração	Susceptibilidade Bacteriana				
	Gram Positivas	Gram Negativas	Anaeróbias	Resistentes às β -Lactamases	Organismos susceptíveis
Primeira	+++	+	++	+	<i>Staphylococcus</i>
Segunda	++	++	++	+	<i>Proteus</i>
Terceira	+	+++	+	++	<i>Pseudomonas</i>
Quarta	+	+++	+	+++	<i>Enterobacteriaceae</i>

Legenda: +++ excelente, ++ muito bom, + bom, – fraco.

O grupo dos carbapenemos inclui o imipenem, o panipenem, o biapenem, o meropenem e o ertapenem (Greene & Boothe, 2012).

Quanto aos monobactams, o aztreonam (único membro deste grupo clinicamente disponível) é resistente às β -lactamases e activo contra uma vasta gama de bactérias de Gram negativo aeróbias e facultativas (Greene & Boothe, 2012).

Os antibióticos inibidores das β -lactamases são de extrema importância e incluem o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. Estes antibióticos β -lactâmicos apresentam uma actividade antibacteriana baixa, no entanto têm a capacidade de se ligarem irreversivelmente e, assim, inactivar as β -lactamases, produzidas pelas bactérias invasoras. *In vitro*, a administração concomitante destes agentes aumenta a actividade das penicilinas e diminui a CMI necessária para inactivar muitos microrganismos produtores de β -lactamases, tais como: staphylococci, *Escherichia coli*, *Capnocytophaga canimorsus*, alguns *Proteus* e *Klebsiella*, *Bacteroides fragilis*, *Salmonella* e *Campylobacter*. No entanto, microrganismos como *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* e *Pseudomonas* permanecem resistentes (Greene & Boothe, 2012).

O mecanismo mais comum de resistência bacteriana aos β -lactâmicos é a produção da enzima β -lactamase, a qual danifica o anel β -lactâmico destes compostos. Nestes casos deve ser associado um inibidor das β -lactamases (Greene & Boothe, 2012).

No entanto, têm vindo a surgir β -lactamases mais fortes, as quais têm como alvo antibióticos β -lactâmicos mais potentes.

1.3- Resistência aos antibacterianos

O uso extensivo de antibacterianos na comunidade e hospitais impulsionou esta problemática (Neu, 1992).

Uma definição de resistência é: “crescimento de uma estirpe na presença de concentrações mais elevadas de antibiótico comparativamente com outras estirpes da mesma espécie” (Périchon & Courvalin, 2009, p.193, tradução livre).

Sob o ponto de vista bioquímico, as bactérias diferem umas das outras pela presença ou ausência de um mecanismo de resistência. Microbiologicamente diferem de acordo com a CMI que apresentam e podem ser caracterizadas clinicamente de acordo com o resultado clínico, isto é, com base no resultado da administração de um agente antibacteriano (sucesso ou falha terapêutica), no tratamento de determinada infecção bacteriana (Périchon & Courvalin, 2009).

A resistência aos antibacterianos pode ser dividida em dois grandes grupos: a resistência intrínseca e a resistência adquirida (Périchon & Courvalin, 2009). Assim, as bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a uma ou mais classes de agentes antibacterianos ou podem adquirir resistência, por uma nova mutação genética ou através da aquisição de genes de resistência a partir de outros microrganismos (Tenover, 2006).

A resistência intrínseca, ou natural, está presente em todas as bactérias de uma determinada espécie ou género. Pode ser considerada como uma “insensibilidade” e, desta forma, traça o espectro de actividade de um antibacteriano. Este tipo de resistência pode ser o resultado de características fisiológicas da espécie bacteriana ou pode resultar da presença de um gene estrutural (Périchon & Courvalin, 2009).

A resistência natural deve-se muitas vezes à inacessibilidade, à baixa afinidade ou à ausência do local de acção do antibacteriano na célula. Por exemplo, a presença de uma membrana externa em bacilos de Gram negativo, tais como *Escherichia coli*, torna-os resistentes a várias classes de antibacterianos (glicopéptideos, macrólidos, lincosamidas) devido à impermeabilidade (Périchon & Courvalin, 2009).

Pseudomonas aeruginosa é um organismo típico que apresenta uma resistência intrínseca a uma ampla gama de substratos, resultante da particularmente baixa permeabilidade da sua membrana externa, o que se deve não só ao número de sistemas de efluxo, como também à

presença de β -lactamases codificadas no seu cromossoma bacteriano (Périchon & Courvalin, 2009).

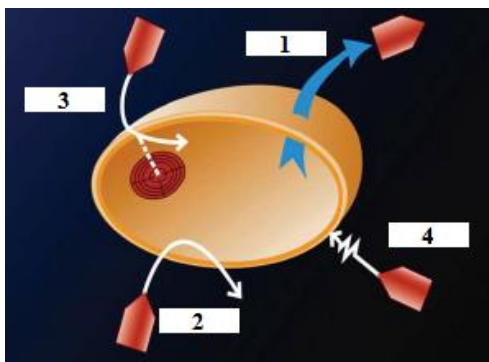
A resistência adquirida está presente em apenas algumas das estirpes da mesma espécie ou género. Em certos casos, pode ser muito prevalente, como a produção de penicilinases em *Staphylococcus* spp. que está presente em mais de 90% das estirpes (Périchon & Courvalin, 2009).

1.3.1- Mecanismos de Resistência

As bactérias de Gram negativo dispõem de um arsenal de mecanismos de resistência e a selecção destes mecanismos pode conduzir à falha terapêutica (Tafur et al., 2008).

De um ponto de vista bioquímico, as bactérias desenvolveram quatro principais mecanismos de resistência (Figura 7): (1) produção de uma enzima que irá inactivar ou modificar o antibacteriano; (2) expressão de bombas de efluxo, responsáveis pela eliminação do antibacteriano; (3) modificação do alvo, o que conduz à perda, à diminuição da afinidade do antibacteriano ou à síntese de um novo alvo e (4) alteração da permeabilidade da membrana externa, devido à perda ou à diminuição do diâmetro de uma porina (poro na membrana externa). Todos estes mecanismos têm em comum o motivo de impedir a interacção do antibacteriano com seu alvo ou local de acção (Périchon & Courvalin, 2009).

Figura 7 - Principais mecanismos de resistência aos antibacterianos: 1) produção de enzimas capazes de destruir os antibacterianos, 2) a expressão de sistemas de efluxo que impedem o antibacteriano de atingir o seu alvo intracelular, 3) modificação do local de acção do antibacteriano e 4) alteração da permeabilidade da membrana externa (adaptado de Périchon & Courvalin, 2009).



O primeiro mecanismo referido, a modificação enzimática do antibacteriano, corresponde ao principal mecanismo de resistência aos antibacterianos β -lactâmicos, macrólidos, aminoglicosídeos e cloranfenicol (Périchon & Courvalin, 2009). Este é o mecanismo de resistência mais comum em bactérias de Gram negativo aos antibióticos β -lactâmicos (Pitout, Sanders & Sanders Jr, 1997; Bush & Jacoby, 2010; Tafur et al., 2008). Este mecanismo deve-se ao facto das bactérias expressarem enzimas capazes de modificar a estrutura dos antibacterianos, fazendo com que estes percam a sua funcionalidade. As enzimas do tipo β -lactamase são as mais prevalentes e têm a capacidade de hidrolizar a ligação amida do anel β -lactâmico presente nos antibióticos β -lactâmicos (Bush & Jacoby, 2010). Os genes que codificam estas enzimas podem encontrar-se no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos. Para além das β -lactamases, as bactérias de Gram negativo podem produzir outras enzimas responsáveis pelo aparecimento de resistência antibacteriana, como as metilases, as acetiltransferases, as nucleotidiltransferases e as fosfotransferases, as quais inactivam especialmente os aminoglicosídeos (Tafur et al., 2008).

As bombas de efluxo estão presentes em cada célula e encontram-se na sua membrana externa. Estes sistemas de efluxo permitem a eliminação de grandes quantidades de moléculas, entre elas, metabolitos, detergentes, solventes orgânicos e antibacterianos. O principal objectivo deste mecanismo é manter baixas as concentrações intracelulares de substâncias tóxicas. As bombas de efluxo podem ser classificadas como específicas para um determinado antibacteriano, as quais são geralmente codificadas em plasmídeos e por isso transmissíveis, ou como inespecíficas, geralmente codificadas no cromossoma bacteriano.

O aumento da expressão de bombas de efluxo inespecíficas pode originar resistências cruzadas a múltiplas classes de antibacterianos, estando em causa apenas um mecanismo de resistência antibacteriana. Estes transportadores podem ser classificados em seis famílias: a família ABC (*ATP binding cassette*), MF (*major facilitator*), MATE (*multidrug and toxic efflux*), RND (*resistance nodulation division*), SMR (*small multidrug resistance*) e DMT (*drug/metabolite transporter superfamily*). Para o seu funcionamento, as bombas de efluxo hidrolizam a adenosina trifosfato (ATP) (família ABC) ou utilizam um mecanismo de contra transporte iónico como substrato energético (Tafur et al., 2008). As bombas de efluxo da família RND são as mais frequentemente encontradas em *P. aeruginosa* e designam-se por MexAB-OprM. O seu papel é crucial na resistência intrínseca que esta espécie bacteriana apresenta a muitos antibióticos β -lactâmicos e também a outras classes de antibacterianos como as fluoroquinolonas e as tetraciclinas (Tafur et al., 2008; Périchon & Courvalin, 2009).

As bactérias de Gram negativo possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolípidos. Esta membrana funciona como uma barreira, sendo os LPS responsáveis pela sua impermeabilidade para muitas moléculas. Assim, algumas proteínas desta membrana, designadas por porinas, actuam como canais aquosos e são utilizados por vários antibacterianos, tais como: β -lactâmicos, cloranfenicol e fluoroquinolonas (Périchon & Courvalin, 2009). As porinas são canais que se encontram na membrana externa das bactérias de Gram negativo e funcionam como filtros numa membrana permeável. Entre outras funções vitais, as porinas têm a capacidade de retardar o acesso dos antibacterianos ao interior da bactéria (Tafur et al., 2008). A alteração da permeabilidade da membrana externa, que resulta na resistência às famílias de antibacterianos em cima mencionadas, pode ser devida à diminuição do número de porinas ou à redução do seu tamanho (Périchon & Courvalin, 2009). As porinas podem ser específicas ou inespecíficas, dependendo da sua selectividade para as moléculas que permitem passar para o interior da célula (Tafur et al., 2008). Em *P. aeruginosa* a resistência intrínseca ao imipenem deve-se à perda da porina OprD, em resposta à sua exposição a este antibiótico. Nas espécies *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* também tem sido documentada a perda de uma porina como responsável da sua resistência aos antibacterianos (Périchon & Courvalin, 2009).

Por fim, a alteração do local de acção dos antibacterianos é um mecanismo de resistência no qual é alterada a estrutura terciária dos locais onde os antibacterianos se ligam para exercerem a sua acção. Os locais de acção podem ser diferentes componentes bacterianos envolvidos em actividades celulares vitais.

Os antibióticos β -lactâmicos têm como alvo as proteínas responsáveis pela transpeptidação, isto é, as proteínas envolvidas na síntese da parede celular, conduzindo assim à lise da parede celular. Desta forma, as alterações estruturais, secundárias a mutações, podem fazer com que diminua a afinidade dos β -lactâmicos às proteínas responsáveis pela síntese da parede celular (PBPs) ou pode levar à formação de novas PBPs, permitindo que a bactéria sobreviva (Tafur et al., 2008; Périchon & Courvalin, 2009). Este mecanismo de resistência antibacteriana é menos frequente nas bactérias de Gram negativo, sendo mais importante nas bactérias de Gram positivo, especialmente em *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina e em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Tafur et al., 2008; Périchon & Courvalin, 2009).

1.3.2- Aquisição de Resistência

Os membros da maior parte das classes de antibacterianos têm vindo a ser usados desde há muito tempo, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, e os mesmos genes de resistência têm sido identificados em bactérias isoladas no Homem, assim como nos animais de companhia (Guardabassi et al., 2004). A presença dos mesmos genes de resistência em bactérias provenientes de diferentes hospedeiros sugere que possa ter ocorrido a sua transferência (Guardabassi et al., 2004).

De um ponto de vista genético, a resistência pode ser adquirida por dois acontecimentos totalmente distintos: através da ocorrência de uma mutação no genoma, que leva à transmissão vertical de resistência para as bactérias descendentes, ou através da aquisição de informação genética externa, isto é, a partir de outras bactérias por transferência horizontal (Périchon & Courvalin, 2009). O genoma bacteriano é constituído pelo cromossoma e por elementos genéticos móveis acessórios, como os plasmídeos e os transposões. O cromossoma contém toda a informação genética necessária para o ciclo de vida da bactéria e, geralmente, não tem a capacidade de ser transferido horizontalmente para outras bactérias. Assim, os genes envolvidos na resistência aos antibacterianos, os genes de resistência e os genes resultantes de mutações que se encontram no cromossoma bacteriano, são transferidos verticalmente para a descendência (Périchon & Courvalin, 2009).

Os plasmídeos e os transposões codificam para funções que não são estritamente necessárias para a vida bacteriana, no entanto oferecem vantagens para o hospedeiro. Os genes de resistência aos antibacterianos são apenas úteis para as bactérias de forma transitória, por esta razão estes genes são muitas vezes transmitidos e fazem parte de elementos genéticos móveis. De facto, qualquer gene pode fazer parte de uma estrutura volátil desde que forneça, transitoriamente, alguma vantagem selectiva para o hospedeiro e que exerça uma pressão selectiva adequada. Assim sendo, os elementos genéticos móveis podem ser transmitidos horizontal e verticalmente (Périchon & Courvalin, 2009).

1.3.2.1- Mecanismos genéticos de resistência aos antibacterianos

A aquisição de novo material genético por bactérias susceptíveis aos antibacterianos a partir de estirpes bacterianas resistentes pode ocorrer através de três processos: conjugação, transformação e transdução (Tenover, 2006; Bennett, 2008).

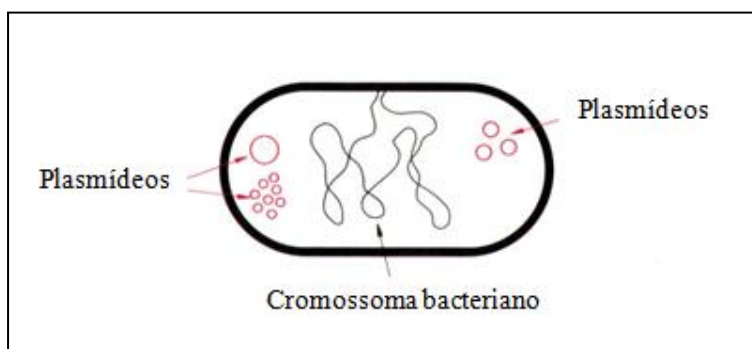
Os elementos genéticos móveis podem ser divididos em dois grupos: elementos que têm a capacidade de se mover de uma bactéria para outra, os plasmídeos e os transposões conjugativos, e elementos que têm a capacidade de se deslocar de um segmento genético para

outro no interior da mesma célula: transposições, integrões e cassetes genéticas (Bennett, 2008).

A transferência de plasmídeos e transposições conjugativos de uma célula para outra envolve mecanismos de replicação, enquanto a transferência de transposições, integrões e cassetes genéticas entre segmentos genéticos da mesma célula necessita de algumas formas de recombinação, que podem ou não incluir processos de replicação (Bennett, 2008).

Os plasmídeos são fragmentos circulares de ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadeia dupla extracromossomais, com capacidade de replicação autónoma (Figura 8). São elementos capazes de transferir uma série de genes bacterianos entre células, isto é, são responsáveis pela chamada transferência horizontal de genes (Bennett, 2008; Moreira & Mendes, 1998).

Figura 8 - Plasmídeos - elementos genéticos encontrados em células bacterianas (adaptado de Moreira & Mendes, 1998).

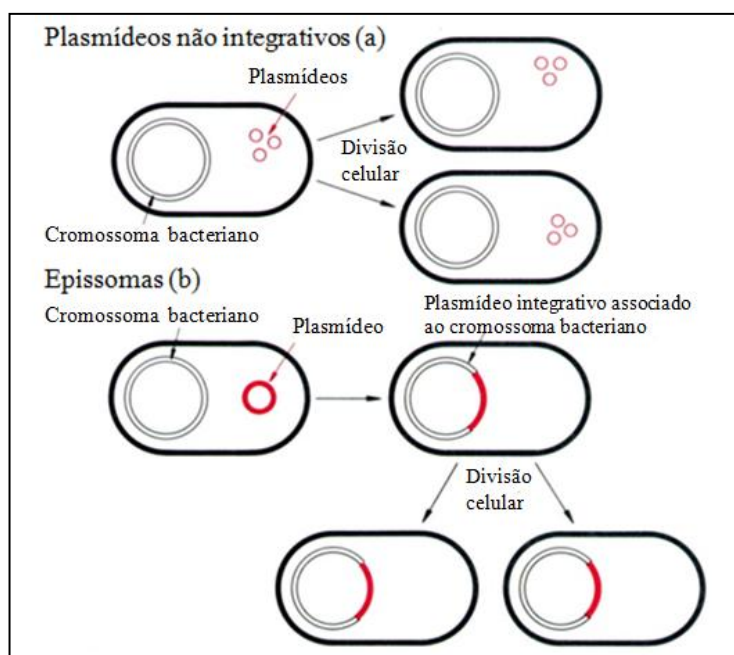


Os plasmídeos estão presentes em praticamente todas as espécies bacterianas e, embora não sejam essenciais para a célula bacteriana, podem conferir novas funções que poderão ser vantajosas em determinadas condições ambientais, como o caso dos genes de resistência aos antibacterianos e os genes que codificam para factores de virulência (adesinas, toxinas). O seu tamanho é muito variável, podendo ir desde 2 ou 3 kilo pares de bases (kb) a mais de 400 kb.

Os plasmídeos podem ser classificados com base nas suas principais características: plasmídeos F ou de fertilidade, plasmídeo R ou de resistência, plasmídeos Col (codificam colicinas), plasmídeos degradativos e plasmídeos virulentos (Moreira & Mendes, 1998).

Os plasmídeos R ou de resistência são aqueles que transportam um ou mais genes que conferem à bactéria hospedeira resistência a um ou mais agentes antibacterianos (Bennett, 2008; Moreira & Mendes, 1998). Alguns tipos de plasmídeo são capazes de se replicarem inserindo-se no cromossoma bacteriano (Figura 9). Estes plasmídeos integrativos ou epissomas podem ser mantidos de um modo estável nesta forma ao longo de numerosas divisões celulares, mas irão em alguma altura existir como elementos independentes (Moreira & Mendes, 1998).

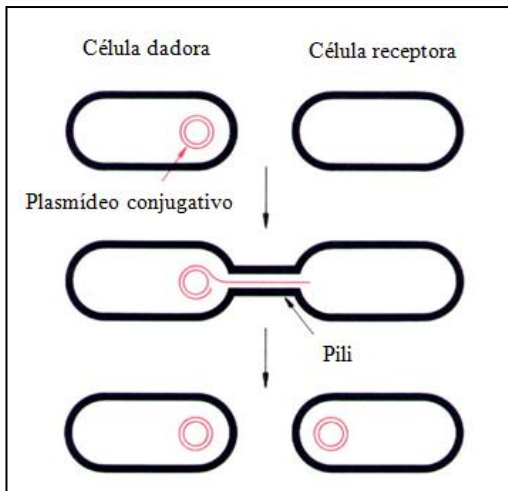
Figura 9 - Estratégias de replicação de plasmídeos não integrativos (a) e integrativos ou epissomas (b) (adaptado de Moreira & Mendes, 1998).



A conjugação é um processo replicativo através do qual a célula doadora e receptora tornam-se portadoras da cópia do mesmo plasmídeo. Neste processo o acoplamento é mediado por um apêndice externo filamentoso chamado de pili, formação que permite unir as células doadora e receptora, contribuindo para a proliferação dos genes de resistência entre bactérias. Para que ocorra a transferência de ADN, uma das cadeias do ADN plasmídico é cortada, pelas endonucleases, para que ocorra a transferência da cadeia simples para a célula receptora, na qual irá ocorrer a síntese da cadeia complementar (Bennett, 2008).

Muitos plasmídeos de resistência são conjugativos, ou seja, são plasmídeos que contêm genes que codificam para proteínas capazes de favorecer a sua transferência para outras bactérias (Figura 10). Desta forma, os plasmídeos conjugativos têm a capacidade de promover a conjugação sexual entre células bacterianas e, conseqüentemente, possibilitam a sua passagem de uma célula para todas as outras células de uma cultura (Bennett, 2008; Moreira & Mendes, 1998).

Figura 10 - Transferência de plasmídeos por conjugação entre células bacterianas (adaptado de Moreira & Mendes, 1998).



Os plasmídeos não conjugativos são transferidos para outras células através da ajuda de plasmídeos conjugativos presentes na mesma célula. Os plasmídeos não conjugativos não possuem os genes necessários para que as células se liguem e ocorra a sua transferência. Estes plasmídeos são bastante pequenos, apresentam 10 kb ou um tamanho menor, enquanto os plasmídeos conjugativos apresentam um tamanho superior, 30 kb ou mais, sobretudo devido à quantidade de ADN necessária para que ocorra o processo de conjugação, o qual é particularmente grande nas bactérias de Gram negativo (20-30 kb) (Bennett, 2008).

No que diz respeito ao espectro de hospedeiros, os plasmídeos conjugativos exibem um estreito espectro de hospedeiros, ou seja, a transferência é restrita a um pequeno número de espécies bacterianas semelhantes. No entanto, existem plasmídeos conjugativos com um amplo espectro de hospedeiros, pois têm a capacidade de alcançar uma vasta gama de diferentes espécies bacterianas, sendo que alguns plasmídeos encontrados em bactérias de Gram negativo parecem não apresentar qualquer limite de hospedeiros de Gram negativo.

Um exemplo de um plasmídeo conjugativo de amplo espectro é o RP1 (*resistance plasmid 1*), inicialmente identificado numa estirpe clínica de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo depois verificada a sua presença em muitas, se não todas, as bactérias de Gram negativo (Bennett, 2008).

A mesma célula pode conter vários tipos diferentes de plasmídeo. De facto, tem-se conhecimento da existência de até sete plasmídeos diferentes, num determinado momento, em células de *Escherichia coli*. Sabe-se que a compatibilidade está na base da sua coexistência na mesma célula, pois se dois plasmídeos forem incompatíveis, a célula perderá rapidamente um deles. A base da incompatibilidade ainda não é bem compreendida, mas pensa-se que certos

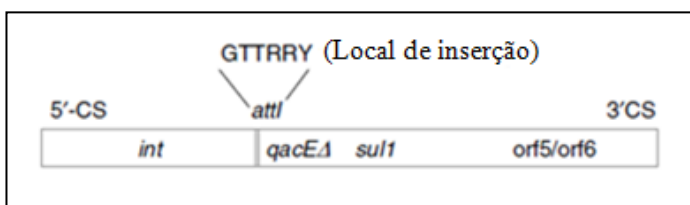
acontecimentos durante a replicação dos plasmídeos estão na base do fenómeno (Moreira & Mendes, 1998).

Os transposões são elementos genéticos capazes de se mover no genoma, entre zonas do mesmo cromossoma ou de um local do cromossoma para um plasmídeo e vice versa, ou de um plasmídeo para outro plasmídeo. Os transposões são constituídos por duas sequências de inserção (SI) que flanqueiam uma sequência de ADN que contém os genes que conferem resistência aos antibacterianos. São essenciais as duas SI localizadas nas extremidades do transposão para a transposição deste elemento genético, o que exige a acção da enzima que codificam – a transposase, a qual permite a inserção e excisão no local específico onde se vão inserir (Bennett, 2008; Périchon & Courvalin, 2009). As SI variam entre transposões e codificam pelo menos para uma função que altera o fenótipo da célula (Bennett, 2008).

No caso de se tratar de transposões conjugativos, a sua transmissão ocorre de forma activa. Por outro lado, a transmissão processa-se de forma passiva caso se trate de transposões não conjugativos, os quais se encontram inseridos em plasmídeos. Sabe-se que os transposões encontram-se frequentemente em plasmídeos (Périchon & Courvalin, 2009).

Os integrões bacterianos são sistemas de captura de genes que não utilizam o mecanismo de transposição, mas sim mecanismos específicos de recombinação (Bennett, 2008).

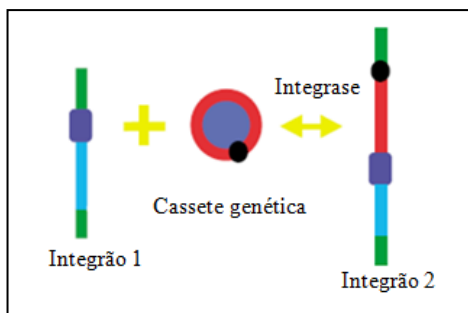
Figura 11 - Esquema de um integrão da classe I (adaptado de Bennett, 2008).



Os integrões encontram-se frequentemente em transposões e os mais comuns pertencem à classe I, constituídos por 2 segmentos terminais conservados 5'CS e 3'CS (*conserved sequences*) separados por uma região central variável (Figura 11) (Bennett, 2008; Périchon & Courvalin, 2009). A região conservada 5'CS contém o gene *int*, que codifica para uma integrase, contém o local de inserção das cassetes genéticas, designado por *attI*, e contempla um promotor que permite a expressão das cassetes genéticas (Figura 11). A região conservada 3'CS contém os genes *qacEΔ1*, que confere resistência a compostos quaternários de amónio, seguido pelo gene *sul1*, que confere resistência a sulfonamidas e por outros dois genes designados *orf5* e *orf6* (*open reading frames*), cuja função não é totalmente conhecida (Figura 11). Entre as duas regiões conservadas encontra-se a região variável, onde as cassetes genéticas (Figura 12), moléculas circulares de ADN que contém os genes de resistência aos

antibacterianos, se podem inserir por recombinação, através do local *attI* do integrão (Bennett, 2008).

Figura 12 – Captura da cassette genética por um integrão bacteriano (adaptado de Bennett, 2008).



Assim, uma vez que as cassetes genéticas não dispõem de promotores, os genes que transportam são expressados graças aos promotores presentes nos integrões. O número de cassetes genéticas inseridas varia de integrão para integrão.

Mais recentemente, foram identificadas cassetes genéticas codificadoras de resistência aos antibacterianos, nomeadamente cassetes genéticas codificadoras de metalo- β -lactamases (IMP e VIM), as quais conferem resistência a agentes β -lactâmicos potentes, os carbapenemos (imipenem e meropenem) (Bennett, 2008).

1.4- Classificação das β -lactamases

As β -lactamases podem ser classificadas com base nas suas características funcionais e na sua estrutura molecular primária. Assim, Ambler (1980) através do conhecimento da sequência de aminoácidos das β -lactamases, determinou uma classificação molecular que define quatro classes: A, B, C e D. As classes A, C e D englobam as enzimas que possuem um resíduo serina no seu centro activo, enquanto as enzimas da classe B possuem iões de zinco no seu centro activo, sendo designadas por metalo- β -lactamases (Bush & Jacoby, 2009).

A classificação funcional proposta por Bush e Jacoby (2009) tem em conta os substratos e os perfis de inibição, agrupando as enzimas de modo a que possam ser relacionadas com o seu fenótipo. Em concreto, as enzimas são agrupadas de acordo com a sua capacidade de hidrolizar classes específicas de β -lactâmicos e nas características dos inibidores das β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (Bush & Jacoby, 2009).

Na classificação funcional as β -lactamases são divididas em quatro grupos, os quais incluem vários subgrupos, com base nas propriedades específicas de cada enzima. O grupo 1

corresponde ao grupo das cefalosporinas ou β -lactamases do tipo AmpC, corresponde à classe C da classificação de Ambler (1980) e está dividido em dois subgrupos: 1 e 1e. Tanto as enzimas do subgrupo 1 como do subgrupo 1e, hidrolisam todos os antibióticos β -lactâmicos, excepto os carbapenemos, e não são inibidas pelo ácido clavulânico. Porém as enzimas do subgrupo 1e apresentam uma maior capacidade hidrolítica das oximino-cefalosporinas (cefotaxima e ceftazidima). O grupo 2 corresponde às classes A e D da classificação de Ambler (1980) e representa o maior grupo de β -lactamases, englobando vários tipos de β -lactamases e portanto vários subgrupos: 2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e e 2f. O subgrupo 2a inclui as penicilinas com poder hidrolítico sobre as benzilpenicilinas (penicilina G) e muitas penicilinas, mas com baixo poder hidrolítico sobre as cefalosporinas, carbapenemos e monobactams, sendo inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. As enzimas pertencentes ao subgrupo 2b hidrolizam as penicilinas e as cefalosporinas da 1ª geração, mas são fortemente inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam.

No subgrupo 2be estão incluídas as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), incluem o padrão hidrolítico do subgrupo anterior, ao qual se adicionam as oximino-cefalosporinas (cefotaxima e ceftazidima) e o aztreonam. O subgrupo 2br compreende β -lactamases de espectro alargado, mas neste caso resistentes ao ácido clavulânico. As enzimas do subgrupo 2ber apresentam um aumento das capacidades hidrolíticas apresentadas pelo subgrupo anterior. O subgrupo 2c engloba as carbenicilinas, enzimas com maior capacidade hidrolítica sobre as carbenicilinas e facilmente inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. As enzimas do subgrupo 2ce são carbenicilinas de espectro alargado, isto é, enzimas com maior poder hidrolítico sobre as carbecilinas e também sobre o cefepime e cefpirome. Os subgrupos seguintes já dizem respeito à classe molecular D, pois até aqui todos os subgrupos do grupo 2 pertencem à classe A. O subgrupo 2d inclui as oxacilinas, sendo variável a inibição pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. As enzimas do subgrupo 2de são cefalosporinas de espectro alargado que hidrolizam a oxacilina e as oximino-cefalosporinas (cefotaxima e ceftazidima), sendo também variável a inibição pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. O subgrupo 2df inclui as carbapenemases, isto é, enzimas com capacidade de hidrolizar os carbapenemos, no entanto apresentam uma capacidade de hidrólise fraca, melhor sobre o imipenem do que sobre o meropenem, e a inibição pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam é variável. O grupo 2e engloba as cefalosporinas com capacidade de hidrolisar as cefalosporinas de espectro alargado e são inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. A fraca afinidade ao aztreonam permite distingui-las das cefalosporinas pertencentes ao grupo 1. O subgrupo 2f inclui as carbapenemases com serina no centro activo

e pertencem à classe A, são enzimas capazes de hidrolizar os carbapenemos e são melhor inibidos pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico. O grupo 3 compreende as metalo- β -lactamases, as quais pertencem à classe B da classificação de Ambler (1980). As enzimas deste grupo hidrolisam os carbapenemos e não são inibidas pelo ácido clavulânico nem pelo tazobactam, mas sim pelo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As metalo- β -lactamases forem divididas em três subclasses: B1, B2 e B3. As enzimas pertencentes às subclasses B1 e B3 apresentam funções semelhantes, pertencem ao subgrupo 3a e têm a capacidade de hidrolizar os carbapenemos, mas não os monobactams. As enzimas pertencentes à subclasse B2 pertencem ao subgrupo 3b e hidrolizam preferencialmente os carbapenemos, em contraste com as penicilinas e as cefalosporinas. O grupo 4 fazia parte da classificação funcional de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), mas foi excluído na classificação mais recente de Bush e Jacoby (2009). Este grupo foi retirado devido à pouca informação disponível e consequente caracterização incompleta deste grupo de enzimas (Bush & Jacoby, 2009).

1.4.1- ESBL

As ESBLs são β -lactamases que conferem resistência às penicilinas, às cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina) e aos oximino- β -lactâmicos, os quais incluem as oximino-cefalosporinas (cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, e cefepima) e o aztreonam (monobactamo), e são inibidas pelos inibidores das β -lactamases, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Bush & Jacoby, 2009; Thomson, 2010; Dierikx et al., 2012; Tafur et al., 2008). No entanto, são incapazes de hidrolizar as cefamicinas (cefoxitina e cefotetan) e os carbapenemos (Tafur et al., 2008).

Uma característica importante das ESBLs é o facto de serem codificadas por elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, os quais proporcionam uma incrível capacidade de disseminação entre bactérias da mesma e de diferentes espécies e por esta razão conferem muitas vezes multirresistência aos antibacterianos (Thomson, 2010; Tafur et al., 2008).

As famílias de ESBLs mais comuns são as TEM, SHV e CTX-M, as menos comuns são as BEL-1, BES-2, SFO-1, TLA-1, TLA-2 e membros das famílias PER e VEB (Thomson, 2010; Tafur et al., 2008; Bush & Jacoby, 2009). Como o nome indica, a maior parte das enzimas CTX-M hidrolizam a cefotaxima mais eficazmente que a ceftazidima e algumas têm a capacidade de hidrolizar o cefepime (cefalosporina de 4ª geração). Por sua vez, as ESBLs do tipo TEM e SHV hidrolizam a ceftazidima com maior eficácia do que a cefotaxima. Contrariamente às enzimas TEM e SHV, as enzimas CTX-M são melhor inibidas pelo tazobactam, do que pelo ácido clavulânico (Bush & Jacoby, 2009; Tafur et al., 2008).

Actualmente, a família de ESBLs dominante é a CTX-M, o que se verifica tanto em humanos como nos animais (Belas et al., 2014).

As ESBLs têm sido reportadas em múltiplas espécies de bactérias de Gram negativo, sendo encontradas mais frequentemente em *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* (Tafur et al., 2008).

A maioria das ESBLs resultam de mutações espontâneas ocorridas noutras enzimas, β -lactamases de espectro reduzido, as quais sofrem alterações na sua estrutura de aminoácidos, que amplificam a sua capacidade hidrolítica (Tafur et al., 2008).

Em 1983 foram detectados em Frankfurt, Alemanha, os primeiros isolados clínicos humanos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBLs (Souza, Torres & Oliveira, 2010).

Nos animais de companhia, a maioria dos relatos de bactérias de Gram negativo produtoras de ESBLs provém da Europa (Santos, Moura, Aguilar-Ramires, Castro & Lincopan, 2013).

A primeira bactéria resistente produtora de ESBL (SHV-12) foi detectada em 1998 em Madrid, Espanha (Santos et al., 2013). Tratava-se de uma estirpe de *Escherichia coli* e foi isolada de uma amostra de urina de um cão com infecções recorrentes do trato urinário (Santos et al., 2013). Em 2007 foi identificada outra ESBL (CTX-M-32) uma *E. coli* uropatogénica num gato com cistite crónica (Pomba et al., 2013) e no ano seguinte, em 2008, outra ESBL (CTX-M-15) também uma *E. coli* uropatogénica num cão com cistite crónica (Pomba et al., 2013).

A emergência e disseminação de ESBLs pelos membros da família Enterobacteriaceae, com origem nos animais de produção e nos animais de companhia constitui um problema de Saúde Pública de grande importância a nível mundial. Nos animais de companhia a prescrição de antibacterianos de largo espectro é uma das principais causas. Este problema não conduz apenas à ineficácia terapêutica, mas também à posterior disseminação de genes codificadores destas enzimas para os humanos (Santos et al., 2013).

1.4.2- AmpC

As β -lactamases do tipo AmpC apresentam um espectro de acção mais alargado que as ESBLs, pois para além das penicilinas, cefalosporinas de 1ª geração e oximino- β -lactâmicos, hidrolizam também as cefamicinas (cefoxitina). Contrariamente às ESBLs, as AmpCs não são inibidas pelos inibidores das β -lactamases (Dierikx et al., 2012; Thomson, 2010; Bush & Jacoby, 2009).

As AmpCs podem encontrar-se codificadas no cromossoma bacteriano ou em segmentos de ADN móveis, como os plasmídeos (Thomson, 2010).

As AmpCs cromossômicas são enzimas que se encontram codificadas no cromossoma bacteriano de uma ampla variedade de bactérias de Gram negativo. Sabe-se que se podem encontrar no cromossoma das seguintes bactérias: *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. (Tafur et al., 2008). Em condições normais, as bactérias codificadoras de AmpCs cromossômicas, produzem estas enzimas em baixas quantidades e por isso não alteram significativamente a sensibilidade às penicilinas, cefamicinas e oximino- β -lactâmicos (Bush & Jacoby, 2009; Thomson, 2010; Tafur et al., 2008). No entanto, quando expostas aos β -lactâmicos, podem ocorrer mutações espontâneas nos genes que regulam a produção de AmpCs cromossômicas, o que leva a uma produção constitutiva ou hiperprodução destas enzimas em quantidade suficiente para que ocorra hidrólise dos antibióticos acima mencionados (penicilinas, cefamicinas e oximino- β -lactâmicos) (Tafur et al., 2008; Bush & Jacoby, 2009; Thomson, 2010).

Assim, as bactérias portadoras de AmpCs constitutivas, isto é, bactérias que não regulam a produção de AmpCs, podem ser seleccionadas durante o tratamento com β -lactâmicos, havendo a possibilidade de adquirir novas resistências (excepto aos carbapenemos) e consequentemente pode ocorrer a sua acumulação na microbiota hospitalar (Tafur et al., 2008; Thomson, 2010).

As AmpCs mediadas por plasmídeos podem ser encontradas nas espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis*, espécies que naturalmente não apresentam AmpCs cromossômicas (Thomson, 2010; Tafur et al., 2008).

No que diz respeito à detecção fenotípica de AmpCs, nas espécies *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis* é possível logo à partida determinar que se tratará de uma AmpC plasmídica, pois estes microrganismos não são portadores de AmpCs cromossomais (Thomson, 2010). No entanto, a detecção fenotípica de uma AmpC em *E. coli* não indica qual o seu tipo. As hipóteses que se podem colocar são: se não houver multirresistência antibacteriana, o provável é tratar-se de uma AmpC cromossomal; se houver multirresistência antibacteriana, pode tratar-se de uma AmpC plasmídica ou cromossomal (Thomson, 2010). Neste caso, é necessário realizar testes moleculares.

As AmpCs plasmídicas são conhecidas desde 1989 e incluem as famílias CMY, ACT, DHA, FOX e MIR. Nos seres humanos são menos comuns que as ESBLs (Bush & Jacoby, 2009), enquanto nos animais de companhia os resultados dos estudos realizados têm sido variáveis (Hordijk et al., 2013; Belas et al., 2014). Entre as AmpCs plasmídicas mais comuns (CMY, FOX e DHA) (Thomson, 2010), as mais frequentemente detectadas em humanos e nos animais são as AmpCs do tipo CMY (Belas et al., 2014).

As AmpCs do tipo CMY são provavelmente os genes de β -lactamases mais disseminados em isolados animais de *E. coli* e *Salmonella* spp. (Li et al., 2007). Nos Estados Unidos da América, em 1999, foram identificados isolados multirresistentes de *E. coli* produtores de CMY-2 (mais tarde classificados como CMY-7) associados com infecções nosocomiais em cães (Sanchez et al., 2002). Em 1999/2000 na Austrália foram identificados os genes *bla*_{CMY-7} plasmídicos em isolados multirresistentes de *E. coli*, detectados num hospital escolar veterinário (Sidjabat et al., 2006) e em 2007 na Europa foram identificados isolados multirresistentes de *E. coli* produtores de CMY-2 em animais com infecção do trato urinário (Tamang et al., 2012).

1.4.3- Carbapenemases

Inicialmente, as carbapenemases eram consideradas enzimas pouco frequentes. No entanto, mais recentemente têm vindo a ser reportados novos casos, o que tem gerado uma crescente preocupação entre os clínicos e os grupos de investigação, não só pelo desafio terapêutico que representa, mas também pelo seu impacto na evolução clínica dos pacientes, pois a resistência aos carbapenemos implica a resistência a outros β -lactâmicos (Tafur et al., 2008).

As carbapenemases são enzimas que apresentam uma grande variabilidade na capacidade de hidrólise dos carbapenemos e de outros β -lactâmicos. A sua detecção é crucial para o controlo da infecção, pois são enzimas associadas muitas vezes à extensa, ou mesmo total, resistência aos antibacterianos e pelo facto da sua presença em microrganismos como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. poder levar à sua posterior transmissão a microrganismos da família Enterobacteriaceae, na qual são desconhecidos os mecanismos de resistência aos carbapenemos. As carbapenemases transmissíveis são mais preocupantes que as cromossomais. As primeiras podem ser adquiridas imprevisivelmente por importantes bactérias patogénicas como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e outras pertencentes à família Enterobacteriaceae. As cromossomais ocorrem previsivelmente em bactérias patogénicas menos comuns: *S. maltophilia*, *Aeromonas* spp., *Chryseobacterium* spp. entre outras (Tafur et al., 2008). Assim sendo, as carbapenemases podem encontrar-se codificadas no cromossoma bacteriano ou em elementos genéticos móveis. Segundo a classificação molecular de Ambler (1980) as carbapenemases com um resíduo de serina no seu centro activo pertencem às classes A e D, e aquelas que contêm pelo menos um ião zinco no seu centro activo, as metalo- β -lactamases, pertencem à classe B (Bush & Jacoby, 2009).

Têm sido identificadas carbapenemases do tipo serina em Enterobacteriaceae e em *Acinetobacter* spp. (Tafur et al., 2008). Em Enterobacteriaceae estão descritas algumas enzimas da classe A como: NMC-A, SME-1-3, KPC 1-4, IMI-1 e GES-2. As enzimas do tipo

KPC são classicamente descritas em Enterobacteriaceae, sobretudo em *K. pneumoniae* (Tafur et al., 2008; Thomson, 2010). Em humanos, foi identificada pela primeira vez a enzima KPC em *K. pneumoniae* nos Estados Unidos da América (Carolina do Norte), a qual foi reportada em 2001 (Yigit et al., 2001). Mais tarde, em 2003, foi reportada a identificação de outra enzima KPC na espécie *Salmonella enterica* isolada em 1998, também nos Estados Unidos da América (Maryland) (Miriagou et al., 2003). Embora menos comum, esta enzima também tem sido identificada em outras bactérias, como na espécie *P. aeruginosa*, na qual foi descrita pela primeira vez em 2006 num isolado de origem humana na Colômbia (Villegas et al., 2007). As carbapenemas desta classe (A) hidrolizam as penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e aztreonam, e são inibidas pelo ácido clavulânico e pelo ácido bórico (Bush & Jacoby, 2009).

As carbapenemas da classe D (OXA 23-27, OXA 40 e OXA 58) podem encontrar-se na espécie *Acinetobacter baumannii*, a maioria das quais são adquiridas por transposões ou plasmídeos.

A sua actividade hidrolítica é inferior às carbapenemas da classe A e às metalo- β -lactamases (Bush & Jacoby, 2009). Assim, hidrolizam as penicilinas, as cefalosporinas de espectro curto, fracamente as cefalosporinas de espectro alargado e os carbapenemos, não hidrolizam o aztreonam e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (Bush & Jacoby, 2009). Devido à sua baixa actividade hidrolítica aos carbapenemos, as carbapenemas do tipo OXA são capazes de conferir resistência aos carbapenemos quando a bactéria expressa um outro mecanismo de resistência, como o encerramento dos canais de porina e a expressão exagerada de bombas de efluxo (Tafur et al., 2008). Em 2007, na Colômbia, foi reportada a primeira OXA-23 em *A. baumannii* em humanos (Tafur et al., 2008). No que diz respeito aos animais, foi identificada pela primeira vez uma bactéria produtora de OXA-23 em Portugal no ano de 2009. Tratava-se da bactéria multirresistente *A. baumannii* isolada num gato com infecção do trato urinário (Pomba et al., 2014). Mais tarde, em 2012 na Bélgica, esta carbapenemase (OXA-23) foi identificada em *Acinetobacter* spp. em equinos (Smet et al., 2012). Quanto à carbapenemase OXA-48, em humanos foi identificada pela primeira vez em 2001 na Turquia em Enterobacteriaceae (Thomas et al., 2013; Carrer et al., 2008; Poirel Hérítier, Tolun & Nordmann, 2004). Nos animais, foi identificada em 2012 na Alemanha, em isolados de origem canina de *E. coli* e *K. pneumoniae* (Stolle et al., 2013).

As metalo- β -lactamases podem ser encontradas em muitas bactérias de Gram negativo como na família Enterobacteriaceae (*Serratia marcescens*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *E. coli*), mas também em *Aeromonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. As principais famílias são: IMP e VIM. As

famílias menos comuns são: SIM, SPM e GIM. As informações genéticas das metalo- β -lactamases são normalmente transportadas em integrões associados a cassetes genéticas (Tafur et al., 2008). Nos humanos, têm sido relatados surtos de metalo- β -lactamases especialmente em *P. aeruginosa* portadoras de VIM nos Estados Unidos da América, na América do Sul e na Europa (Tafur et al., 2008) e na Colômbia foram identificadas as enzimas VIM-8 e VIM-2 em *P. aeruginosa* (Tafur et al., 2008). Porém, as metalo- β -lactamases foram originalmente identificadas em isolados de *K. pneumoniae* em 1994 no Japão (Paterson & Bonomo, 2005). Nos animais, o primeiro relato da produção de uma metalo- β -lactamase (VIM-1) proveio de uma exploração pecuária na Alemanha em 2012, com origem numa estirpe de *E. coli* isolada de um porco (Fischer et al., 2012). Em 2008/2009 foi identificada pela primeira vez a NDM-1 em estirpes de *E. coli* multirresistentes em cães e gatos nos Estados Unidos da América (Shaheen, Nayak & Boothe, 2013).

1.5- Colonização nosocomial

O termo nosocomial significa que pertence ou é originário de um hospital (Blood & Studdert, 2002). A infecção nosocomial é definida como uma infecção adquirida pelo paciente após a hospitalização (internamento) num ambiente hospitalar, que se manifesta durante o período de hospitalização ou após a alta, desde que relacionada com os procedimentos realizados durante esse período (Rodrigues, 2013).

O termo colonização corresponde à presença transitória de microrganismos colonizadores em hospedeiros, sem que ocorra invasão tecidual. Quando a colonização é referente a objectos inanimados, como superfícies, o termo correcto é contaminação (Arias, Aiello, Battaglia & Freitas, 2013). O animal colonizado torna-se portador, pois tem um importante papel na disseminação dos microrganismos que aloja (Blood & Studdert, 2002).

A distinção dos termos colonização e infecção é muito importante. O termo infecção diz respeito às lesões decorrentes da multiplicação e da acção dos microrganismos patogénicos e/ou dos seus produtos tóxicos no hospedeiro, ocorrendo uma interacção imunológica (Arias et al., 2013).

Vários factores podem favorecer a ocorrência de colonização nosocomial, a qual pode facilitar a ocorrência de uma infecção nosocomial. As infecções nosocomiais podem ter origem endógena, isto é, podem resultar de bactérias resistentes pertencentes ao animal, ou podem ter origem exógena, por exemplo a partir do ambiente hospitalar e objectos contaminados (Arias et al., 2013).

1.6- Factores de risco

Em humanos, calcula-se que 50 a 60% dos mais de 2 milhões de casos de infecção hospitalar que ocorrem anualmente nos Estados Unidos sejam causados por bactérias resistentes, as quais são responsáveis por cerca de 77.000 mortes por ano (Tafur et al., 2008).

Os factores responsáveis pela ocorrência de infecções nosocomiais em humanos estão a tornar-se cada vez mais comuns nos animais, situação que pode ser explicada pelas mudanças ocorridas nos cuidados de saúde animal. Assim, factores como o aumento da quantidade e qualidade dos cuidados intensivos, o uso de dispositivos intravasculares e de sondas vesicais, o aumento do tempo de hospitalização, o uso indiscriminado de antibacterianos, a realização de cirurgias com colocação de implantes e o uso de fármacos imunossupressores, podem ser alguns dos factores responsáveis pela ocorrência de infecções nosocomiais nos animais (Arias et al., 2013).

Os extremos de idade (animais jovens ou velhos), assim como a gravidade da doença também estão descritos como factores que predispõem para infecções nosocomiais (Maddison et al., 2008). Os factores de risco contribuem numa primeira fase, para o aumento de bactérias comensais resistentes aos antibacterianos, resultante da pressão selectiva que promove a colonização com uma maior quantidade de bactérias resistentes. A proliferação destas bactérias faz com que aumente a probabilidade de ocorrência de infecção, a qual pode ocorrer em qualquer local do organismo, como nas feridas cirúrgicas (Ogeer-Gyles et al., 2006).

Em medicina veterinária existem vários estudos que relatam factores de risco responsáveis pelo desenvolvimento de infecção do local cirúrgico em animais de companhia (Arias et al., 2013; Nelson, 2011; Rodrigues, 2013). A infecção do local cirúrgico (ILC) corresponde a uma infecção pós-operatória que ocorre na região da ferida cirúrgica (Rodrigues, 2013). Este termo foi definido em 1998 pelo *Centers for Disease Control and Prevention*, o qual recomenda o uso do termo infecção do local cirúrgico (ILC) em substituição à infecção da ferida cirúrgica propriamente dita, uma vez que nem toda a infecção relacionada à manipulação cirúrgica ocorre na própria ferida, mas também em órgãos ou espaços abordados durante a cirurgia (Rodrigues, 2013). A ILC é um processo infeccioso que pode manifestar-se até 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico ou até 1 ano, caso seja colocado um implante ou prótese (Rodrigues, 2013).

Alguns autores dividem os factores de risco para a ocorrência de ILC em factores do paciente, factores ambientais e factores relacionados com o tratamento (Nelson, 2011). Os factores do paciente incluem doenças como a diabetes mellitus, a condição corporal (desnutrição ou obesidade), extremos de idade, tratamento cirúrgico recente, entre outros. Os factores

ambientais incluem a inadequada desinfecção/esterilização, medicação contaminada, inadequada ventilação, a inadequada antissépsia da pele e a tricotomia do local cirúrgico mais de 2 horas antes da indução anestésica. Por fim, alguns dos factores relacionados com o tratamento são a colocação de drenos, a realização de procedimentos urgentes, hipotermia, inadequada profilaxia antibacteriana, o uso prolongado de antibacterianos após o procedimento cirúrgico, assim como tempos prolongados de internamento e de cirurgia e o tipo de procedimento cirúrgico (Nelson, 2011; Arias et al., 2013; Rodrigues, 2013).

A administração de antibacterianos constitui um factor de risco para a aquisição de bactérias patogénicas resistentes aos antibacterianos comum aos seres humanos e aos animais de companhia (Belas et al., 2014; EMA, 2013; Wedley et al., 2011; Costa et al., 2007).

O uso inadequado de profilaxia antimicrobiana faz com que a microbiota normal do paciente seja alterada durante a terapêutica, tornando-se assim mais resistente a um grande número de antimicrobianos, sendo este um importante factor de risco para a ocorrência de infecção nosocomial (Rodrigues, 2013). No entanto, um estudo realizado por Ogeer-Gyles (2006) não encontrou uma associação significativa entre a resistência antibacteriana de isolados rectais de *E. coli* e o tratamento antibacteriano realizado, nos quais se inserem os antibióticos β -lactâmicos, durante a hospitalização na unidade de cuidados intensivos de um Hospital Veterinário Escolar.

A hospitalização (o internamento) constitui um factor de risco bem descrito em medicina humana como responsável pelo aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antibacterianos. Está descrito que a prevalência destes agentes em pacientes humanos aumenta com o aumento do tempo de hospitalização nas unidades de cuidados intensivos (Ogeer-Gyles et al., 2006).

Embora pouco se saiba sobre a influência da duração da hospitalização na prevalência de bactérias resistentes aos antibacterianos em animais, o estudo de Ogeer-Gyles et al. (2006) demonstrou haver uma associação estatisticamente significativa ($P=0.006$) entre a resistência aos antibacterianos testados, entre os quais se encontram os antibióticos β -lactâmicos, e a duração da hospitalização, numa unidade de cuidados intensivos de num Hospital Veterinário Escolar.

Sanchez et al. (2002) demonstraram a existência de bactérias resistentes no ambiente hospitalar de um Hospital Veterinário Escolar, concluindo que as estirpes isoladas nos pacientes doentes correspondiam às mesmas estirpes detectadas no ambiente. Este estudo reforça os resultados obtidos por Ogeer-Gyles et al. (2006), pois para além da duração da hospitalização, o contacto com o ambiente hospitalar contaminado pode contribuir para a colonização com estirpes bacterianas resistentes.

1.7- Riscos para a Saúde Pública

Muitos estudos têm vindo a demonstrar que os antibacterianos usados nos animais de produção contribuem para a selecção de resistências antibacterianas e que colocam em risco os humanos, devido à possível transmissão de bactérias resistentes zoonóticas através da cadeia alimentar, conduzindo à transferência de genes de resistência (EMA, 2013; Guardabassi et al., 2004). Para além desta forma de transmissão, os humanos podem adquirir bactérias resistentes através do contacto directo entre pessoas, da exposição ao ambiente e do contacto directo com animais (Guardabassi et al., 2004).

A proximidade entre os animais de companhia e os humanos oferece condições favoráveis para a transmissão de bactérias. Assim, podem ser consideradas duas vias de transmissão: a via fecal-oral - através do contacto directo, como carícias, lambidelas, lesões físicas, e a via ambiental - através de fomites, como superfícies do ambiente doméstico contaminadas (móveis, comida) (Santos et al., 2013; Guardabassi et al., 2004; Procter et al., 2014).

As crianças apresentam um maior risco de colonização do que os adultos, pois muitas vezes apresentam um contacto físico mais próximo com os animais de companhia, assim como com o ambiente doméstico contaminado (chão, tapetes) (Guardabassi et al., 2004).

Meyer (2012) demonstrou que o contacto prévio com animais de companhia aumenta em cerca de sete vezes a hipótese de colonização com bactérias resistentes, nomeadamente bactérias produtoras de ESBLs (Santos et al., 2013).

Sabe-se que estirpes de *E. coli* envolvidas nas infecções do trato urinário em cães são filogeneticamente relacionadas com as estirpes humanas de *E. coli* extra-intestinais patogénicas. Assim, foi descoberto que 15% dos depósitos fecais caninos encontrados no ambiente contêm estirpes de *E. coli* intimamente relacionados com os clones de *E. coli* humanas patogénicas. Estes dados indicam que o conteúdo fecal canino pode representar um importante reservatório para a aquisição de bactérias patogénicas, neste caso de origem humana (Guardabassi et al., 2004).

Uma vez que os animais de companhia representam potenciais fontes de disseminação de bactérias resistentes, tem vindo a ser recomendada a monitorização regular da sua microbiota normal, no que diz respeito à presença de bactérias resistentes aos antibacterianos (Belas et al., 2014; Martel, Tardy, Sanders & Boisseau, 2001). Este facto deve-se sobretudo à emergência de bactérias resistentes, não só produtoras de β -lactamases, mas também outras como *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes e *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina-resistentes, tanto em animais saudáveis como doentes. Um dos estudos que evidencia este facto é de Wedley et al. (2011) no qual foram isoladas 69 estirpes de *E. coli*

com resistência antibacteriana em 53/183 amostras fecais obtidas em cães saudáveis. Outro exemplo é apresentado no estudo de Hordijk et al. (2013), o qual demonstrou que 45% dos cães saudáveis testados se encontravam colonizados com bactérias da família Enterobacteriaceae produtoras de ESBL/AmpC, isoladas a partir de amostras fecais. Estes estudos traduzem o potencial risco de transmissão de bactérias resistentes para os humanos a partir dos animais de companhia.

Muito recentemente, a Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (2013) publicou um Plano de Acção Nacional para a redução do uso de antibióticos nos animais, que entrou em vigor no dia 1 de Janeiro de 2014. Os objectivos deste plano são: a promoção e o reforço da protecção da saúde animal, da saúde humana e, ainda, fomentar o recurso a técnicas e meios alternativos aos antibióticos em animais produtores de alimentos para consumo humano, através da formação e sensibilização de utilizadores de medicamentos veterinários antibióticos, da venda responsável, da redução dos riscos associados ao seu uso, do armazenamento e da gestão dos seus resíduos. Este plano realça também a importância do contributo da investigação e da aplicação do conhecimento científico e tecnológico adquirido na melhoria dos meios e instrumentos disponíveis aos profissionais, incluindo meios complementares ou alternativos à utilização medicamentos veterinários antibióticos.

Assim, a vigilância e a consciencialização da transmissão de resistência antibacteriana zoonótica entre animais de companhia e humanos são de extrema importância para a saúde pública, pois podem comprometer seriamente o resultado do tratamento e consequentemente a saúde e bem-estar animal e humano (EMA, 2013).

2- Objectivos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa (ULisboa) com os objectivos de:

- Detectar a presença e quantificar a colonização nosocomial do trato gastrointestinal por bactérias de Gram negativo produtoras de β -lactamases: β -lactamases de espectro alargado (ESBL), cefalosporinases (AmpC) e Carbapenemases, em cães submetidos a tratamento cirúrgico;
- Identificar quais os factores de risco responsáveis pela colonização e pelo aumento da carga bacteriana.

3- Materiais e Métodos

As amostras foram recolhidas de cães no Hospital Escolar da FMV-ULisboa durante a realização do estágio curricular (Anexo I). Foram considerados dois grupos de amostras: o grupo de controlo do ambiente e o grupo de cirurgia.

O grupo de controlo do ambiente é constituído por cães que contactam com o ambiente hospitalar e que vivem perto deste, nomeadamente cães pertencentes à equipa hospitalar e académica e residentes dos canis. Este grupo constituiu um útil indicador da possível contaminação bacteriana a partir do ambiente. O grupo de cirurgia incluiu os cães que se dirigiram ao Hospital para serem submetidos a um tratamento cirúrgico.

A recolha das amostras fecais foi feita nos meses de Fevereiro a Julho de 2014.

No total foram recolhidas amostras fecais a 43 cães pertencentes ao grupo de controlo do ambiente (C1ca, n=43) e a 25 cães do grupo de cirurgia. No grupo de cirurgia as amostras fecais foram recolhidas em tempos diferentes: na admissão ao Hospital antes da cirurgia, onde se recolheram amostras a 25 cães (C1cx, n=25) e após a cirurgia obtiveram-se amostras de 22 cães (C2cx, n=22). Para 3 cães não se conseguiu obter o *follow up* por diversos motivos, como morte do animal.

Foi pedido a cada dono que recolhesse uma amostra das fezes do seu animal para um recipiente esterilizado ou, no caso de não ter, para um recipiente de plástico limpo (saco, caixa).

Cada amostra fecal foi identificada com um código individual para cada animal e a cada uma foi associado um questionário (Anexos II e III).

As amostras recebidas foram levadas para Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas (LRAB) da FMV-ULisboa, onde foram refrigeradas. O processamento das amostras ocorreu até um dia após a colheita.

3.1- Processamento das amostras

As amostras foram analisadas para a pesquisa de bactérias de Gram negativo produtoras de ESBLs, AmpCs e de Carbapenemases, através de um protocolo desenvolvido pelo LRAB da FMV-ULisboa (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1- Protocolo laboratorial de isolamento de bactérias de Gram negativo produtoras de β -lactamases (ESBL, AmpC e Carbapenemases) a partir de amostras fecais de cão.

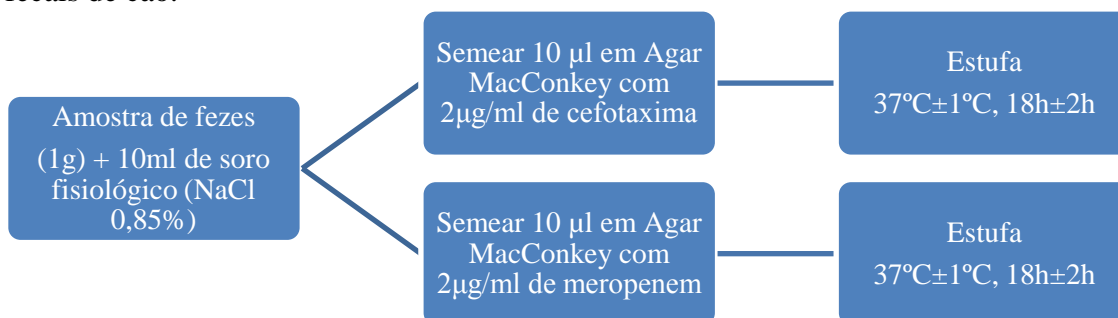
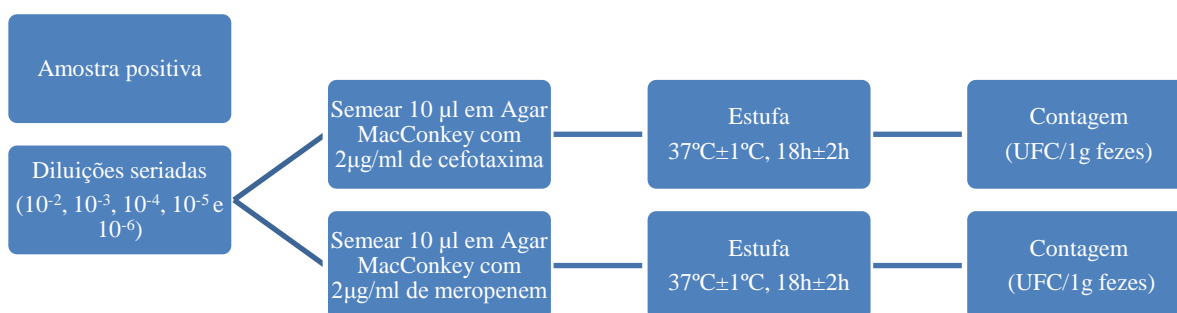


Gráfico 2 - Protocolo laboratorial para a quantificação de bactérias de Gram negativo produtoras de β -lactamases (ESBL, AmpC e Carbapenemases) a partir de amostras fecais de cão.



Para cada amostra, pesou-se 1 grama de fezes num copo esterilizado e adicionou-se 10 ml de soro fisiológico (NaCl 0,85%), para obter uma diluição 1:10 (10^{-1}). A solução foi homogeneizada e semeada com uma ansa de 10µl por estria numa placa de agar MacConkey com 2µg/ml de cefotaxima e noutra placa com 2µg/ml de meropenem, de forma a serem isoladas bactérias resistentes à cefotaxima e ao meropenem, respectivamente. As placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$ (Gráfico 1).

Para as amostras onde se verificou crescimento de colónias bacterianas (as amostras positivas), foram feitas diluições seriadas (Gráfico 2). Para se proceder às diluições recorreu-se à solução inicial (10^{-1}) que se encontrava refrigerada. Foram transferidos 10µl da solução inicial para um tubo de centrifugação, no qual tinham sido colocados 90µl de soro fisiológico (NaCl 0,85%), obtendo-se assim a solução 1:100 (10^{-2}).

As restantes diluições (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram obtidas da mesma forma. Por fim, com uma ansa de 10µl foi semeada por estria cada diluição, nas respectivas placas e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

Para todas as amostras positivas foi feita a contagem da carga bacteriana a partir da diluição onde a sua contagem era menor. Assim, a quantificação teve por base a quantidade de microrganismo alvo por unidade de peso de amostra fecal, ou seja, foi determinada em unidades formadoras de colónias (UFC) por 1 grama de fezes.

Todas as soluções iniciais (10^{-1}), tanto as correspondentes às amostras negativas como às positivas, foram guardadas a -20°C em glicerol a 25%. Quanto às colónias suspeitas, quando isoladas, foram repicadas para placas de agar sangue. Depois da incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h} \pm 2\text{h}$, as colónias foram guardadas em glicerol a 20% a -20°C .

3.2- Identificação bacteriana das bactérias de Gram negativo isoladas

3.2.1- Extracção de ADN

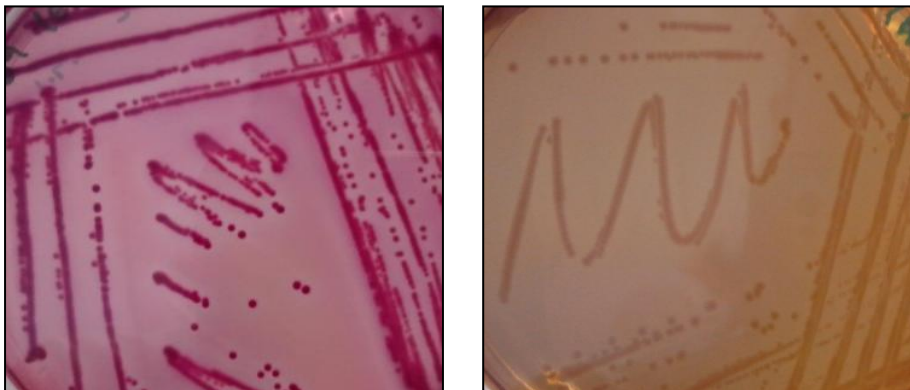
A extracção de ADN foi feita a partir de colónias isoladas em placas de agar sangue pelo método de fervura utilizado no LRAB.

Num tubo de centrifugação colocou-se 1000µl de água MiliQ e uma fracção de colónias de cultura pura e levou-se a centrifugar durante 8 minutos a 16,110g (rotor F-45-24-11, Eppendorf 5415D, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o depósito em 500µl de água MiliQ. Voltou-se a centrifugar a amostra durante 2 minutos a 16,110g. Decantou-se o sobrenadante e repetiu-se o último passo. Após nova decantação, ressuspendeu-se o depósito em 100µl de água MiliQ e ferveu-se em banho-maria durante 15 minutos. Voltou-se a centrifugar durante 8 minutos a 16,110g e recolheu-se o sobrenadante para um tubo novo de centrifugação, o qual foi guardado a -20°C .

3.2.2- Identificação Bacteriana

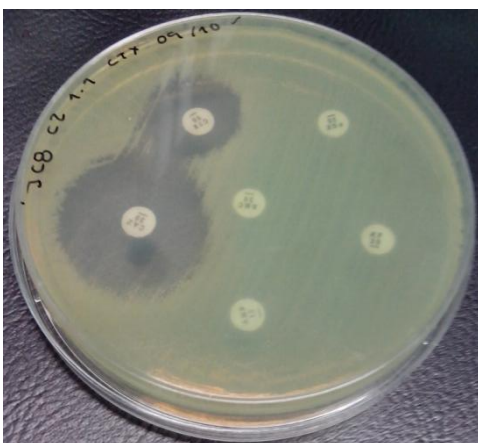
Procedeu-se à realização de reacção em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) para proceder à identificação genotípica e determinação do grupo filogenético a partir das amostras de ADN extraído das colónias suspeitas de corresponder a *Escherichia coli* (com base em critérios morfológicos, tais como a cor [Figura 13]).

Figura 13- Aspecto morfológico de bactérias de Gram negativo em meio de agar MacConkey: bactérias fermentadoras da lactose da espécie *E. coli* (esquerda) e bactérias não fermentadoras da lactose (direita).



As restantes estirpes isoladas resistentes às cefalosporinas de 3ª geração foram classificadas em 3 categorias: outras fermentadoras (Outras F) – características morfológicas de bactérias fermentadoras excluindo a espécie *E.coli* e o género *Pseudomonas* spp. – bactérias não fermentadoras que quando semeadas em meio Mueller Hinton alteram a sua cor para verde (Figura 14), e outras não fermentadoras (Outras NF) - características morfológicas de bactérias não fermentadoras excluindo o género *Pseudomonas* spp.

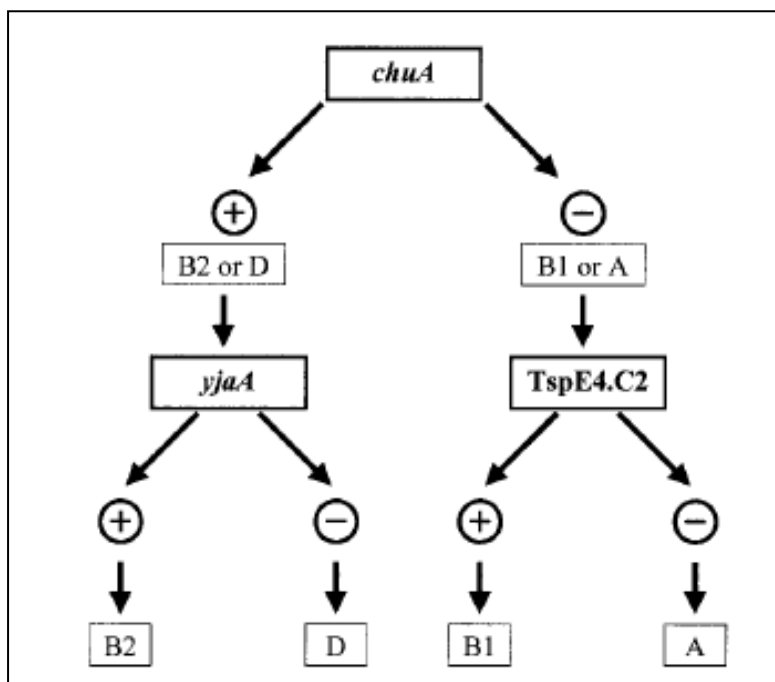
Figura 14 - Alteração da cor do meio Mueller Hinton (para verde), indicativo da presença de bactérias do género *Pseudomonas* spp.



As bactérias da espécie *E. coli* apresentam quatro grupos filogenéticos principais: A, B1, B2 e D (Figura 15). Os marcadores destes grupos são os genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de ADN designado por TSPE4.C2. O gene *gadA* é um gene específico de *E. coli*, o qual codifica a enzima glutamato descarboxilase.

O gene *gadA* serve de controlo interno da amplificação nos casos em que nenhum dos outros genes é identificado, servindo assim para garantir o sucesso ou não da amplificação (Doumith, Day, Hope, Wain & Woodford, 2012).

Figura 15 - Chave dicotómica para determinar o grupo filogenético da espécie *E. coli*, através do resultado da amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e o fragmento de ADN TSPE4.C2 (Clermont, Bonacorsi & Bingen, 2000).



O protocolo utilizado para a realização da reacção de PCR foi estabelecido pelo LRAB da FMV-ULisboa, adaptado de Doumith (2012), tendo em conta os *primers* necessários e a *Taq polymerase* utilizada.

Tabela 1 - Sequência genómica dos *primers* GADA, CHUA, YJAA e TSPE4.C2 *forward* (F) e *reverse* (R) utilizados no PCR para identificação dos isolados suspeitos de *E. coli* segundo Doumith et al. (2012).

Marcador	Direcção do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')
<i>gadA</i>	Forward	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG
	Reverse	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC
<i>chuA</i>	Forward	ATGATCATCGCGGCGTGCTG
	Reverse	AAACGCGCTCGCGCCTAAT
<i>yjaA</i>	Forward	TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT
	Reverse	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA
TSPE4.C2	Forward	GCGGGTGAGACAGAAACGCG
	Reverse	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG

Este PCR foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 3µl de ADN;
- 1µl (10pmol/ml) de cada um dos *primers*, excepto dos *primers* CHUAF e CHUAR, dos quais foram colocados 2µl (10pmol/ml) (Tabela 1);
- 0,5µl de *Taq polymerase* (Dreamtaq, 5U/µl);
- 5µl de tampão 10x Dreamtaq;
- 1,5µl de MgCl₂ (25 mM);
- 0,8µl de dNTPs mix (25 mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a ordem da sua execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (4 minutos a 94°C);
- 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65° C) e extensão (30 segundos a 72°C);
- 1 processo de extensão final (5 minutos a 72°C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% (2 gramas de agarose em 100 ml de Tris-Borato-EDTA [TBE] 0.5x ou Tris-Acetato-EDTA [TAE] 1x) corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas, a 4,5 V/cm.

Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* Nzytech III (200 a 10000 pb) como marcador de peso molecular de ADN e em cada poço de gel de agarose foram colocados 10µl de cada amostra. Por fim, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

As bactérias isoladas nas placas de agar MacConkey com meropenem foram identificadas através do sistema de identificação Api.

O Api é um sistema de identificação associado a uma galeria de testes bioquímicos e a uma base de dados. Neste trabalho foram usados dois dos vários sistemas de identificação Api existentes: o Api 20E e o Api 20NE.

O Api 20 NE permite a identificação de bacilos de Gram negativo não enterobactérias e não fastidiosos, enquanto o Api 20E permite a identificação de bacilos de Gram negativo não fastidiosos como os pertencentes à família Enterobacteriaceae entre outros.

A escolha do Api depende do resultado do teste da oxidase (Figura 16). Assim, para todas as bactérias em causa foi realizado este teste, a partir do qual foi possível escolher o tipo de Api. Para as bactérias oxidase positivas foi realizado o Api 20NE e para as bactérias oxidase negativas o Api 20E.

Figura 16 - Teste da oxidase: resultado positivo (tira esquerda) e resultado negativo (tira direita).



3.3- Identificação fenotípica – susceptibilidade aos antibacterianos

Para testar a susceptibilidade dos isolados foi utilizado o método de difusão de discos. Foram feitos 2 painéis de antibióticos em discos (Oxoid, Hampshire, United Kingdom). Um dos painéis incluiu os discos de ampicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), cefalotina (30µg), cefoxitina (30µg), cefotaxima (30µg) e ceftazidima (30µg). O outro painel de antibióticos, para além dos antibióticos descritos antes, incluiu os discos de imipenem (10µg), meropenem (10µg), ertapenem (10µg), aztreonam (30µg) e piperacilina/tazobactam (100/10µg).

Foram utilizadas placas de agar Mueller-Hinton e colónias de cultura pura das estirpes suspeitas. Os resultados foram lidos após incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-20h e interpretados de acordo com os critérios do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” para bactérias de origem humana (CLSI, 2014), pois para bactérias de origem animal os dados mais recentes não dispõem de critérios para os antibióticos testados (Tabelas 2, 3 e 4).

De acordo com os padrões fenotípicos de resistência apresentados, foi possível confirmar a sua resistência ao antibiótico utilizado no seu isolamento inicial (cefotaxima e meropenem). Foram considerados 2 painéis de antibióticos com o objectivo de perceber qual o padrão de resistência de cada estirpe e no caso de se tratar de uma estirpe produtora de β -lactamases, tentar identificar qual seria a β -lactamase em causa. Para as estirpes isoladas no meio com cefotaxima foi realizado o painel de antibióticos que incluía a amoxicilina/ácido clavulânico e as cefalosporinas, para detectar a presença de uma β -lactamase do tipo ESBL ou AmpC. Para as estirpes isoladas no meio com meropenem foi realizado o painel que incluía os antibióticos anteriores e ainda os carbapenemos, o aztreonam e a piperacilina/tazobactam, com o objectivo de, para além de detectar a presença de uma ESBL ou AmpC, tentar identificar a presença de uma carbapenemase e qual o seu tipo.

A detecção fenotípica de ESBLs foi realizada a partir do método de duplo disco para detecção de sinergias entre cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico (*Double-disk synergy test* – DDST) (Drieux, Brossier, Sougakoff & Jarlier, 2008). No que diz respeito às β -lactamases do tipo AmpC, estas ao contrário das ESBLs, não são inibidas pelo ácido clavulânico e têm a capacidade de hidrolizar as cefamicinas (cefexitina e cefotetan), o que permite fazer a distinção (Thomson, 2010). Para a detecção fenotípica de carbapenemases foi avaliada a resistência aos carbapenemos.

A interpretação fenotípica teve em conta a resistência intrínseca característica de algumas espécies bacterianas (Leclercq et al., 2011).

Tabela 2 - Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos para Enterobacteriaceae (CLSI, 2014). Critérios usados para as estirpes isoladas dos meios com cefotaxima e meropenem.

Grupo do antibiótico β -lactâmico	Antibiótico	Disco (μ g)	Diâmetro (mm)		
			S	I	R
Penicilinas	Ampicilina (AMP)	10	≥ 17	14-16	≤ 13
Penicilinas associadas	Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC)	30	≥ 18	14-17	≤ 13
Cefalosporinas	Cefalotina (KF)	30	≥ 18	15-17	≤ 14
	Cefoxitina (FOX)	30	≥ 18	15-17	≤ 14
	Cefotaxima (CTX)	30	≥ 26	23-25	≤ 22
	Ceftazidima (CAZ)	30	≥ 21	18-20	≤ 17
Penicilinas associadas	Piperacilina/tazobactam (TZP)	100/10	≥ 21	18-20	≤ 17
Carbapenemos	Imipenem (IMP)	10	≥ 23	20-22	≤ 19
	Ertapenem (ETP)	10	≥ 22	19-21	≤ 18
	Meropenem (MEM)	10	≥ 23	20-22	≤ 19
Monobactamos	Aztreonam (ATM)	30	≥ 21	18-20	≤ 17

Legenda: S – susceptível, I – susceptibilidade intermédia, R – resistente

Tabela 3 - Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos para *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2014). Critérios usados para as estirpes isoladas dos meios com cefotaxima e meropenem.

Grupo do antibiótico β -lactâmico	Antibiótico	Disco (μ g)	Diâmetro (mm)		
			S	I	R
Penicilinas	Ampicilina (AMP)	10	Resistência intrínseca		
Penicilinas associadas	Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC)	30	Resistência intrínseca		
Cefalosporinas	Cefalotina (KF)	30	Resistência intrínseca		
	Cefoxitina (FOX)	30	Resistência intrínseca		
	Cefotaxima (CTX)	30	Resistência intrínseca		
	Ceftazidima (CAZ)	30	≥ 18	15-17	≤ 14
Penicilinas associadas	Piperacilina/tazobactam (TZP)	100/10	≥ 21	15-20	≤ 14
Carbapenemos	Imipenem (IMP)	10	≥ 19	16-18	≤ 15
	Ertapenem (ETP)	10	Resistência intrínseca		
	Meropenem (MEM)	10	≥ 19	16-18	≤ 15
Monobactamos	Aztreonam (ATM)	30	≥ 22	16-21	≤ 15

Legenda: S – susceptível, I – susceptibilidade intermédia, R – resistente

Tabela 4 - Critérios utilizados na interpretação do método de difusão de discos para *Burkholderia cepacia* (CLSI, 2014). Critérios usados para as estirpes isoladas dos meios com cefotaxima e meropenem.

Grupo do antibiótico β -lactâmico	Antibiótico	Disco (μ g)	Diâmetro (mm)		
			S	I	R
Penicilinas	Ampicilina (AMP)	10	Resistência intrínseca		
Penicilinas associadas	Amoxicilina/ácido clavulânico (AMC)	30	Resistência intrínseca		
Cefalosporinas	Cefalotina (KF)	30	Resistência intrínseca		
	Cefoxitina (FOX)	30	Resistência intrínseca		
	Cefotaxima (CTX)	30	Resistência intrínseca		
	Ceftazidima (CAZ)	30	≥ 21	≥ 21	≥ 21
Penicilinas associadas	Piperacilina/tazobactam (TZP)	100/10	Resistência intrínseca		
Carbapenemos	Imipenem (IMP)	10	Resistência intrínseca		
	Ertapenem (ETP)	10	Resistência intrínseca		
	Meropenem (MEM)	10	≥ 20	16-19	≤ 15
Monobactamos	Aztreonam (ATM)	30	Resistência intrínseca		

Legenda: S – susceptível, I – susceptibilidade intermédia, R – resistente

Nos critérios CLSI (2014) usados, para a categoria “outras não Enterobacteriaceae” só estão disponíveis dados referentes às CMIs. Assim, para as estirpes isoladas que não pertencem à família Enterobacteriaceae e que não pertencem às espécies mencionadas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*) foram usados os critérios de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta extrapolação teve por base a comparação entre as CMIs de *P. aeruginosa* com as CMIs da categoria "outras não Enterobacteriaceae". Verificou-se que as CMIs para os antibióticos CAZ, ATM, TZP são iguais, no entanto as referentes aos antibióticos IMP e MEM são diferentes. Contudo apesar desta diferença, foram usados os critérios de *P. aeruginosa* para as estirpes que não pertencem à família Enterobacteriaceae.

3.4- Identificação genotípica

Após a realização dos testes de susceptibilidade aos antibacterianos, foram realizadas reacções de PCR para identificar qual ou quais os genes responsáveis pelas resistências observadas aos antibióticos β -lactâmicos.

Foi realizado PCR *multiplex* β -lactamases desenvolvido por Pomba et al. (2006) para a detecção dos genes de resistência *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, e *bla*_{OXA-1}. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe *E. coli* 5825/04 (estirpe produtora dos genes *bla*_{OXA-1} e *bla*_{TEM}) (Pomba, da

Fonseca, Baptista, Correia & Martínez-Martínez, 2009) e a estirpe *E. coli* K12 (produtora do gene *shv-5*).

Este PCR foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 2µl de ADN;
- 1µl (10pmol/ml) de cada um dos *primers*, excepto dos *primers* SHVF e SHVR, dos quais foram colocados 3µl (10pmol/ml) (Tabela 5);
- 0,3µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);
- 5µl de tampão 10x sem MgCl₂;
- 6µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,5µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a ordem da sua execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (7 minutos a 94° C);
- 30 ciclos de hibridação (5 minutos a 61° C), extensão (1 minuto a 72° C) e desnaturação (1 minuto a 94° C);
- 1 processo de hibridação (2 minutos a 61° C);
- 1 processo de extensão final (5 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, as cadeias amplificadas foram submetidas a electroforese em gel de agarose a 1,2% (1,2 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas, a 4,5 V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e em cada poço de gel de agarose foram colocados 10µl de cada amostra. Por fim, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

A reacção de PCR para detecção das β-lactamases do tipo CTX-M, foi realizado segundo Eldestein, Pimkin, Palagin, Edelstein e Stratchounski (2003) e como controlo positivo foi utilizada a estirpe *E. coli* 5825/04.

Este PCR foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 2µl de ADN;
- 1,25µl (10pmol/ml) de cada um dos *primers* CTXMF e CTXMR (Tabela 5);
- 0,5µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);
- 10µl de tampão 5x sem MgCl₂;

- 3µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,4µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (7 minutos a 94° C);
- 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), hibridação (2 minutos a 57° C) e extensão (1 minuto a 72° C);
- 1 processo de extensão final (10 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

Tabela 5 - Lista de *primers* utilizados no PCR *multiplex* β-lactamases (Pomba et al., 2006) e no PCR CTX-M (Eldestein et al., 2003).

Gene	Primer	Direcção do primer	Sequência do primer (5'-3')
<i>bla</i> _{TEM}	P1	Forward	TACGATACGGGAGGGCTTAC
		Reverse	TTCCTGTTTTTGCTCACCCA
<i>bla</i> _{SHV}	SHV	Forward	TCAGCGAAAAACACCTTG
		Reverse	TCCCGCAGATAAATCACCA
<i>bla</i> _{OXA-1}	OXA1	Forward	TATCTACAGCAGCGCCAGTGCG
		Reverse	CGCATCAAATGCCATAAGTG
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTXM	Forward	TTTGCGATGTGCCAGTACCAGTAA
		Reverse	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA

O protocolo de PCR utilizado para detecção das β-lactamases do tipo CTX-M dos grupos 1, 2, 8, 9 e 25 , foi realizado de acordo com Woodford, Fagan & Ellington (2005).

No PCR CTX-M grupo 1 foi utilizado o controlo positivo *E. coli* 5825/04. Foi feito num volume final de 25µl e para cada reacção utilizou-se:

- 1µl de ADN;

- 0,5µl (10pmol/ml) de cada *primer* CTX-M-1F e CTX-M-1R (Tabela 6);
- 0,25µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);
- 5µl de tampão 5x sem MgCl₂;
- 1,5µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,2µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,13µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (7 minutos a 94° C);
- 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), hibridação (2 minutos a 57° C) e extensão (1 minuto a 72° C);
- 1 processo de extensão final (10 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

No PCR CTX-M grupo 2 foi utilizado o controlo positivo ML17567. Foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 2µl de ADN;
- 2µl (10pmol/ml) de cada *primer* CTX-M-2F e CTX-M-2R (Tabela 6);
- 0,5µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);
- 10µl de tampão 5x sem MgCl₂;
- 5,5µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,4µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (7 minutos a 94° C);
- 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), hibridação (2 minutos a 57° C) e extensão (1 minuto a 72° C);

— 1 processo de extensão final (10 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

A reacção de PCR CTX-M grupo 8 foi efectuada num volume final de 25µl e para cada reacção utilizou-se:

- 1µl de ADN;
- 1µl (10pmol/ml) de cada *primer* CTX-M-8F e CTX-M-8R (Tabela 6);
- 0,2µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);
- 5µl de tampão 5x sem MgCl₂;
- 5,25µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,2µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,13µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (5 minutos a 95° C);
- 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95° C), hibridação (2 minutos a 57° C) e extensão (1 minuto a 72° C);
- 1 processo de extensão final (10 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

No PCR CTX-M grupo 9 foi utilizado o controlo positivo DB79D. Foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 2µl de ADN;
- 2µl (10pmol/ml) de cada *primer* CTX-M-9F e CTX-M-9R (Tabela 6);
- 0,5µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);

- 10µl de tampão 5x sem MgCl₂;
- 5,5µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,4µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (3 minutos a 94° C);
- 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), hibridação (30 segundos a 59° C) e extensão (1 minuto a 72° C);
- 1 processo de extensão final (7 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

A reacção de PCR CTX-M grupo 25 foi feita num volume final de 25µl e para cada reacção utilizou-se:

- 1µl de ADN;
- 1µl (10pmol/ml) de cada *primer* CTX-M-25F e CTX-M-25R (Tabela 6);
- 0,2µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);
- 5µl de tampão 5x sem MgCl₂;
- 5,25µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,2µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,13µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (5 minutos a 95° C);
- 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 95° C), hibridação (45 segundos a 57° C) e extensão (1 minuto a 72° C);
- 1 processo de extensão final (10 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

Tabela 6 - Lista de *primers* utilizados nas reacções de PCR CTX-M *simplex* para os vários grupos testados (Woodford et al., 2005).

<i>Primer</i>	Direcção do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')
CTX-M-1	Forward	AAA AATCACTGCGCCAGTTC
	Reverse	AGCTTATTCATCGCCACG TT
CTX-M-2	Forward	CGACGCTACCCCTGCTATT
	Reverse	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG
CTX-M-8	Forward	TCGCGTTAAGCGGATGATGC
	Reverse	AACCCACGATGTGGGTAGC
CTX-M-9	Forward	CAAAGAGAGTGCAACGGATG
	Reverse	ATTGGAAAGCGTTCATCACC
CTX-M-25	Forward	GCACGATGACATTCGGG
	Reverse	AACCCACGATGTGGGTAGC

A reacção de PCR para detecção das β-lactamases do tipo AmpC foi realizada segundo Pérez-Pérez e Hanson (2002) e foram pesquisados os genes de resistência *bla*_{MOX-1}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{MIR}, *bla*_{ACT-1} e *bla*_{FOX-5}. Os controlos positivos utilizados foram: a estirpe *Klebsiella* Nu2936 (estirpe produtora do gene *bla*_{MOX-1}), a estirpe *Proteus mirabilis* 1089/07 (estirpe produtora do gene *bla*_{CMY-2}), a estirpe *E. coli* J53 PMG 144 (estirpe produtora do gene *bla*_{DHA-1}), a estirpe *Klebsiella* 96D (estirpe produtora do gene *bla*_{MIR}), a estirpe *E. coli* J53 PMG 251 (estirpe produtora do gene *bla*_{ACT-1}) e a estirpe *E. coli* J53 PMG 252 (estirpe produtora do gene *bla*_{FOX-2}). Este PCR foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 2µl de ADN;
- 2µl (10pmol/ml) dos *primers* FOXMF e FOXMR, 2,5µl (10pmol/ml) dos *primers* ACCMF, ACCMR, EBCMF e EBCMR e 3µl (10pmol/ml) dos *primers* MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF e DHAMR (Tabela 7);

- 0,5µl de *Taq polymerase* (NZYtech, 5U/µl);
- 10µl de tampão 5x sem MgCl₂;
- 3µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,5µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (3 minutos a 94°C);
- 25 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65°C) e extensão (1 minuto a 72°C);
- 1 processo de extensão final (7 minutos a 72°C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% (2 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foram utilizados 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

Tabela 7 - Lista de *primers* utilizados na reacção de PCR *multiplex* AmpC (Pérez-Pérez & Hanson, 2002).

Gene	<i>Primer</i>	Direcção do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')
<i>bla</i> _{MOX-1}	MOXM	Forward	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT
		Reverse	CACATTGACATAGGTGTGGTGC
<i>bla</i> _{CMY-2}	CITM	Forward	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA
		Reverse	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC
<i>bla</i> _{DHA-1}	DHAM	Forward	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT
		Reverse	CCGTACGCATACTGGCTTTGC
<i>bla</i> _{MIR}	ACCM	Forward	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA
		Reverse	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC
<i>bla</i> _{ACT-1}	EBCM	Forward	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG
		Reverse	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT
<i>bla</i> _{FOX-5}	FOXM	Forward	AACATGGGGTATCAGGGAGATG

		Reverse	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG
--	--	---------	-----------------------

A reacção de PCR para detecção de carbapenemases foi realizada segundo Poirel et al. (2011) e foram pesquisados os genes de resistência *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{AIM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{GIM}, *bla*_{BIC}, *bla*_{SIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{DIM} e *bla*_{KPC}.

A reacção de PCR *multiplex* para a detecção de *bla*_{OXA-48}, *bla*_{BIC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} teve como controlos positivos: a estirpe *Enterobacter cloacae* (estirpe produtora de *bla*_{OXA-48}), a estirpe *E. cloacae* (estirpe produtora de *bla*_{OXA-163}), a estirpe *Citrobacter freundii* (estirpe produtora de *bla*_{OXA-181}), a estirpe *Pseudomonas aeruginosa* (estirpe produtora de *bla*_{BIC-1}), a estirpe *Klebsiella pneumoniae* (estirpe produtora de *bla*_{NDM-1}) e a estirpe *K. pneumoniae* (estirpe produtora de *bla*_{KPC-2}). Este PCR foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 1µl de ADN;
- 1µl (10pmol/ml) de cada *primer*, excepto dos *primers* NDMF e NDMR, dos quais foram colocados 1,5µl (10pmol/ml) (Tabela 8);
- 0,4µl de *Taq polymerase* (Dreamtaq Fermentas, 5U/µl);
- 5µl de tampão 10x com MgCl₂;
- 0,4µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (10 minutos a 95°C);
- 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95° C), hibridação (30 segundos a 60° C) e extensão (50 segundos a 72° C);
- 1 processo de extensão final (5 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% (2 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foi utilizado 5µl de ADN *Ladder* V como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

Para a detecção de *bla*_{AIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} e *bla*_{DIM} foram utilizados como controlos positivos: a estirpe *Pseudomonas aeruginosa* (estirpe produtora de *bla*_{AIM-1}), a estirpe *P. aeruginosa* (estirpe produtora de *bla*_{GIM-1}), a estirpe *Acinetobacter baumannii* (estirpe produtora de *bla*_{SIM-1}) e a estirpe *P. stutzeri* (estirpe produtora de *bla*_{DIM-1}). Este PCR foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 1µl de ADN;
- 1µl (10pmol/ml) de cada um dos *primers* (Tabela 8);
- 0,4µl de *Taq polymerase* (Nzytech, 5U/µl);
- 10µl de tampão 10x com MgCl₂;
- 4µl de MgCl₂ (25mM);
- 0,4µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (10 minutos a 94°C);
- 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94° C), hibridação (30 segundos a 55° C) e extensão (50 segundos a 72° C);
- 1 processo de extensão final (5 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% (2 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foi utilizado 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

No PCR *multiplex* para detecção de *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} e *bla*_{VIM} foram utilizados como controlos positivos: a estirpe *Klebsiella pneumoniae* (estirpe produtora de *bla*_{IMP-1}), a estirpe *Pseudomonas aeruginosa* (estirpe produtora de *bla*_{VIM-2}) e a estirpe *P. aeruginosa* (estirpe produtora de *bla*_{SPM-1}). Este PCR foi feito num volume final de 50µl e para cada reacção utilizou-se:

- 1µl de ADN;
- 1µl (10pmol/ml) de cada um dos *primers* (Tabela 8);
- 0,4µl de *Taq polymerase* (Dreamtaq Fermentas, 5U/µl);

- 5µl de tampão 10x com MgCl₂;
- 0,4µl de dNTPs mix (25mM);
- 0,26µl de DMSO 5%;
- Água MiliQ.

Os ciclos de amplificação utilizados consistiram nas seguintes fases, descritas segundo a sua ordem de execução:

- 1 processo de desnaturação inicial (10 minutos a 95°C);
- 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95° C), hibridação (30 segundos a 55° C) e extensão (50 segundos a 72° C);
- 1 processo de extensão final (5 minutos a 72° C).

Após a reacção de PCR, os produtos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% (2 grama de agarose em 100 ml de TBE 0.5x ou de TAE 1x), corado com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 3 horas a 4,5V/cm. Foi utilizado 5µl de ADN *Ladder* como marcador de peso molecular de ADN e foram colocados 10µl de amostra em cada poço de gel de agarose. No final, observaram-se os resultados da electroforese sob radiação ultra-violeta.

Tabela 8 - Lista de *primers* utilizados no PCR *multiplex* para detecção de Carbapenemases (Poirel et al., 2011).

<i>Primer</i>	Direcção do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')
OXA	Forward	GCGTGGTTAAGGATGAACAC
	Reverse	CATCAAGTTCAACCCAACCG
BIC	Forward	TATGCAGCTCCTTTAAGGGC
	Reverse	TCATTGGCGGTGCCGTACAC
NDM	Forward	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC
	Reverse	CGGAATGGCTCATCACGATC
KPC	Forward	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG
	Reverse	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG
AIM	Forward	CTGAAGGTGTACGGAAACAC
	Reverse	GTTCGGCCACCTCGAATTG
GIM	Forward	TCGACACACCTTGGTCTGAA
	Reverse	AACTTCCAACCTTGCCATGC
SIM	Forward	TACAAGGGATTCTGGCATCG

	Reverse	TAATGGCCTGTTCCCATGTG
DIM	Forward	GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG
	Reverse	CGTTCGGCTGGATTGATTTG
IMP	Forward	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC
	Reverse	GGTTTAAYAAAACAACCACC
SPM	Forward	AAAATCTGGGTACGCAAACG
	Reverse	ACATTATCCGCTGGAACAGG
VIM	Forward	GATGGTGTTTGGTCGCATA
	Reverse	CGAATGCGCAGCACCAG

3.5- Análise estatística

Para a concretização da análise dos potenciais factores de risco foram analisadas as respostas dadas aos questionários realizados (Anexos IV, V e VI) para todos os cães.

Foram analisados estatisticamente apenas os potenciais factores de risco relativos aos cães com isolados de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3^a geração, uma vez que foi bastante menos expressivo o número de cães com isolados de bactérias resistentes aos carbapenemos.

Os potenciais factores de risco para a ocorrência de colonização, analisados para os cães do grupo de cirurgia em C1cx e para os cães do grupo C1ca foram os seguintes: idade, sexo, residente, vive com outros animais, administração de antibacteriano no último ano e hospitalização no último ano. A variável “residente” diz respeito aos cães que contactam com o ambiente hospitalar no seu dia a dia, isto é, são os cães que pertencem à equipa hospitalar e académica e os residentes dos canis. Para o grupo C1ca foram ainda analisadas as seguintes variáveis, como potenciais factores de risco para a ocorrência de colonização nosocomial: tempo de contacto com a FMV e a frequência de contacto com a FMV. A variável “tempo de contacto com a FMV” diz respeito ao número de anos que os cães frequentaram a FMV e a variável “frequência de contacto com a FMV” diz respeito à frequência com que os cães contactavam com o ambiente da FMV. Assim, para esta última variável (“frequência de contacto com a FMV”) os resultados obtidos foram agrupados em duas categorias: a categoria de maior frequência, que incluiu as idas diárias e as idas três vezes por semana à FMV, e a categoria de menor frequência, que incluiu a frequência de quinze dias por mês, uma vez por mês, duas vezes por mês e uma vez em cada dois meses.

Para os cães do grupo de cirurgia em C2cx foram analisados os seguintes potenciais factores de risco para a ocorrência de colonização: tipo de cirurgia (Tecidos moles ou Ortopédica), se

foi uma cirurgia electiva e os dias de administração de antibacterianos. A variável “dias de administração de antibacterianos” corresponde ao número de dias que o cão tomou o(s) antibacteriano(s) após a cirurgia, até à realização da colheita da amostra fecal.

Quanto à quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3^a geração, para os cães do grupo de cirurgia em C2cx foi analisada a relação entre o número de dias de administração de antibacterianos e a quantidade de bactérias resistentes determinada. Por sua vez, para os cães do grupo C1ca foram analisadas as variáveis “tempo de contacto com a FMV” e “frequência de contacto com a FMV”, de forma a perceber qual a sua relação com o aumento da quantidade de bactérias de Gram negativo resistentes às cefalosporinas de 3^a geração.

Assim, para os dois grupos em estudo, o grupo de cirurgia em C1cx e em C2cx e o grupo C1ca, foi feita a análise estatística para perceber se o aumento de cães colonizados era estatisticamente significativo, assim como as contagens bacterianas.

O número de animais colonizados, assim como a quantificação de bactérias resistentes foram analisados estatisticamente com o programa *The Glimmix* do *software* SAS (V.9.3; SAS Institute Inc). Os potenciais factores de risco para a ocorrência de colonização e os relativos à quantificação bacteriana foram analisados com o programa *The Logistic* e com o programa *The GLM (General Linear Models)*, respectivamente, ambos pertencentes ao *software* SAS (V.9.3; SAS Institute Inc).

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de *P* iguais ou inferiores a 0,05.

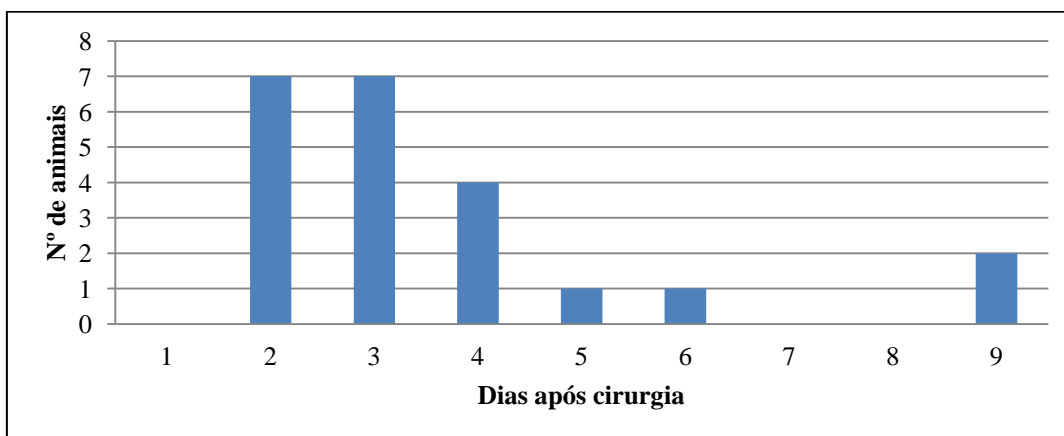
4- Resultados e Discussão

A pesquisa de bactérias de Gram negativo resistentes aos antibióticos β -lactâmicos foi realizada a partir de amostras fecais recolhidas dos cães em estudo. O recurso a amostras fecais é considerado “*gold standard*” para o estudo da microbiota bacteriana do trato gastrointestinal em geral, sendo em alguns casos utilizada a zaragatoa rectal devido a considerações práticas (Lerner et al., 2013; Lautenbach et al., 2005). A amostra fecal permite a realização de testes quantitativos, pois a quantidade de amostra analisada não varia (Lerner et al., 2013), o que não acontece nos procedimentos com zaragatoas rectais e que pode conduzir ao aparecimento de resultados falso negativos (D’Agata, Gautam, Green & Tang, 2002). Neste trabalho a quantificação foi feita em unidades formadoras de colónias (UFC) por 1 grama de fezes, tal como noutros estudos (Girlich, Bouihat, Poirel, Benouda & Nordmann, 2013).

Obtiveram-se 43 amostras fecais de cães pertencentes ao grupo de controlo do ambiente (C1ca, n=43). No grupo de cirurgia, na admissão ao hospital (antes da cirurgia) recolheram-se 25 amostras fecais (C1cx, n=25) e após a cirurgia obtiveram-se 22 amostras fecais (C2cx, n=22).

A recolha das amostras após a cirurgia (C2cx) foi realizada, em média, 4 dias após a cirurgia (mínimo 2 dias e máximo 9 dias), como representado no Gráfico 3.

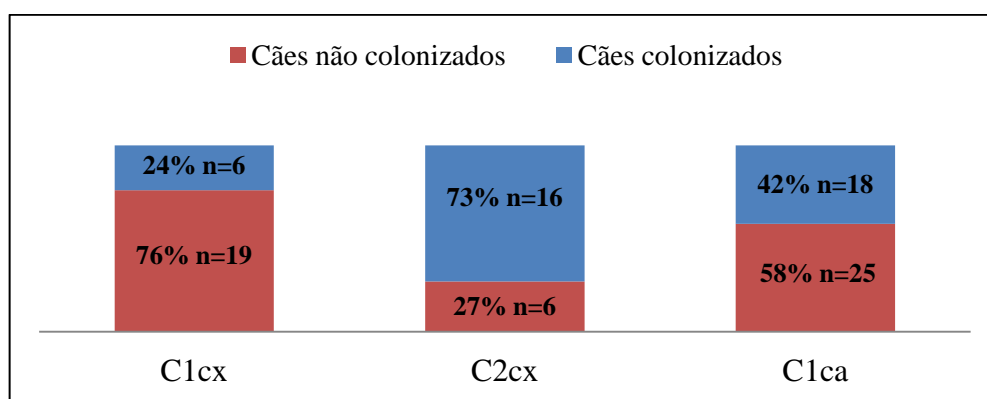
Gráfico 3 - Dia de recolha da amostra fecal no grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx, n=22).



4.1- Colonização por bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração

Quanto ao número de cães colonizados com bactérias resistentes à cefotaxima, cefalosporina de 3ª geração colocada no meio de onde foram isoladas, no grupo de cirurgia na admissão ao hospital (C1cx) 24% (6/25) dos cães estavam colonizados e no grupo após a cirurgia (C2cx) 73% (16/22). No grupo de cães pertencentes ao controle do ambiente (C1ca) 42% (18/43) dos cães estavam colonizados (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Cães colonizados com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima).



A análise estatística demonstrou que o aumento de cães colonizados no grupo C1ca (42%) foi estatisticamente significativo relativamente ao número de cães colonizados no grupo de cirurgia em C1cx (24%), com um $P=0,03$.

Até ao momento não são conhecidos dados relativos à colonização nosocomial por bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração em cães saudáveis que contactam com o ambiente hospitalar. No entanto, foi realizado um estudo por Bergstrom et al. (2012) relativo à colonização nosocomial em cães saudáveis por *Staphylococci* meticilina-resistentes. Neste estudo, realizado num Hospital Veterinário Universitário na Suécia, foram analisados 34 cães saudáveis que contactavam com o ambiente hospitalar quanto à presença de *Staphylococcus pseudointermedius* meticilina-resistentes (methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* [MRSP]) e de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA]). Os autores não detectaram nenhum cão colonizado com bactérias multirresistentes MRSP e MRSA, contrariamente ao resultado obtido no presente trabalho, no qual foram identificados 18 cães (42%) colonizados com as bactérias multirresistentes pesquisadas.

Nos humanos são conhecidos alguns estudos relativos à colonização nosocomial com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3^a geração, em humanos saudáveis que contactam com o ambiente hospitalar. Um exemplo é o estudo de Gupta et al. (2004), realizado num Hospital nos EUA na unidade de cuidados intensivos neonatais em 2001, ano em que ocorreu um surto de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. Assim, não foram apenas investigados os pacientes, mas também os profissionais de saúde, em dois dos quais foi isolada a estirpe responsável pelo surto. Por outro lado, March et al. (2010) realizou um estudo numa unidade de cuidados continuados em Itália e identificou 14,5% de trabalhadores colonizados com bactérias produtoras de ESBL.

Existem inúmeros estudos sobre a colonização por MRSA em profissionais do Sistema de Saúde. Um estudo muito recente de Kapil, Bhavsar & Madan (2015), realizado num Hospital na Índia e no qual foram analisados 60 profissionais de saúde, demonstrou a presença de *Staphylococcus aureus* nas mãos de 8 profissionais de saúde, sendo que 3 correspondiam a *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA). Nesse mesmo estudo foram também detectadas 3 pessoas colonizadas com Enterobacteriaceae produtoras de ESBL. Outro exemplo, é o estudo de Rashid, Farzana, Sattar & Murtaza (2012) realizado num Hospital Pediátrico no Paquistão e no qual também foram analisados os profissionais de saúde. A prevalência de MRSA identificada nesse estudo foi de 13,95%, bastante inferior ao resultado obtido no presente trabalho (42%). No estudo de Kaur & Narayan (2014), realizado num Hospital na Índia, a percentagem de profissionais de saúde colonizados com MRSA (14,28%) foi muito semelhante à apresentada no estudo de Rashid et al. (2012) e mais uma vez bastante inferior ao valor obtido no presente trabalho (42%).

No que diz respeito aos cães pertencentes ao grupo de cirurgia antes da cirurgia, obtiveram-se 24% de cães colonizados com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3^a geração (C1cx=24%). Não são conhecidos dados relativos à colonização com as bactérias estudadas em cães na admissão ao hospital. Porém, existem alguns estudos relativos à colonização em cães saudáveis na comunidade, os quais permitem a discussão dos resultados obtidos no presente trabalho (C1cx=24%). No estudo realizado por Hordijk et al. (2013) na Holanda, foram analisados cães e gatos saudáveis sem contacto com ambiente hospitalar. Os autores detectaram uma percentagem elevada (45%, n=9/20) de cães colonizados com Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases (ESBLs/AmpCs), mas nenhum gato se encontrava colonizado. Haenni, Saras, Métayer, Médaille & Madec (2014) detectou uma prevalência de 18,5% de cães saudáveis (num total de 368 cães saudáveis) colonizados com bactérias da família das Enterobacteriaceae produtoras de ESBL/AmpC, em França.

Outro estudo realizado por Procter et al. (2014) demonstrou que 12,7% das 237 estirpes de *E. coli*, isoladas de cães que frequentaram parques em três cidades do Canadá, eram resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. O estudo de Costa et al. (2008), realizado em Portugal, demonstrou que apenas 2,6% (n=2) das 78 estirpes de *E. coli* isoladas de cães saudáveis apresentaram resistência à cefotaxima. Recentemente o estudo de Belas e colaboradores (2014), também realizado em Portugal, demonstrou uma prevalência de 26% de bactérias *E. coli* resistentes à cefotaxima, numa população de 151 cães saudáveis.

O valor de colonização com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3^a geração obtido no presente trabalho (24%) foi bastante superior ao obtido no estudo de Costa et al. (2008) (2,6%), o que pode estar relacionado com o aumento da prevalência de bactérias resistentes na comunidade e por essa razão hoje em dia existem um maior número de animais colonizados. Por outro lado, o estudo actual de Procter et al. (2014) também demonstrou um percentagem relativamente baixa (12,7%). Os estudos recentes de Hordikj et al. (2013) e de Belas et al. (2014) evidenciam valores de colonização mais elevados comparativamente ao valor obtido no presente trabalho. O resultado obtido no estudo de Belas et al. (2014) (26%) é bastante semelhante ao obtido neste trabalho (24%), o que está de acordo com o facto de ambos os estudos terem sido realizados na população de canídeos na mesma região geográfica (região metropolitana de Lisboa).

Comparativamente com os dados obtidos em estudos relativos à colonização em cães com *Staphylococci* meticilina-resistentes, os valores são bastante diferentes. Um exemplo é o estudo de Bergstrom et al. (2012) no qual foram analisados 45 cães no momento da admissão a um Hospital Veterinário Universitário da Suécia e foi apenas detectado um cão (2,2%) colonizado com MRSP. O estudo de Hanselman, Kruth & Weese (2008) obteve resultados muito semelhantes, das amostras colhidas de 193 cães no momento da admissão ao Hospital Veterinário Escolar no Canadá, foram detectados 4 cães (2,1%) colonizados com MRSP e apenas 1 cão (0,5%) colonizado com MRSA. Por outro lado, no estudo de Hoet et al. (2013), realizado num Hospital Veterinário Escolar dos EUA, obtiveram-se percentagens mais elevadas de cães colonizados com MRSA no momento de admissão ao hospital (5,7%; 25/435).

Nos humanos, dados relativos à presença de bactérias resistentes na comunidade são muito variáveis. O estudo de Valenza et al. (2014), realizado na comunidade Alemã, identificou 6,3% de pessoas colonizadas com bactérias *E. coli* resistentes à cefotaxima. Neste mesmo estudo é feita a comparação com outros países: países com valores mais baixos, como a Suíça (5,8%) e a França (6,0%), países com valores ligeiramente mais elevados, como o Japão (6,4%) e a Tunísia (7,3%) e países com valores muito superiores, China (50%), Egipto (63%)

e a Tailândia (65,7%). No estudo de Villar, Baserni & Jugo (2013) foram analisadas 164 pessoas pertencentes à comunidade Argentina e também se obteve uma elevada percentagem (26,8%) de Enterobacteriaceae resistentes às cefalosporinas de 3ª geração.

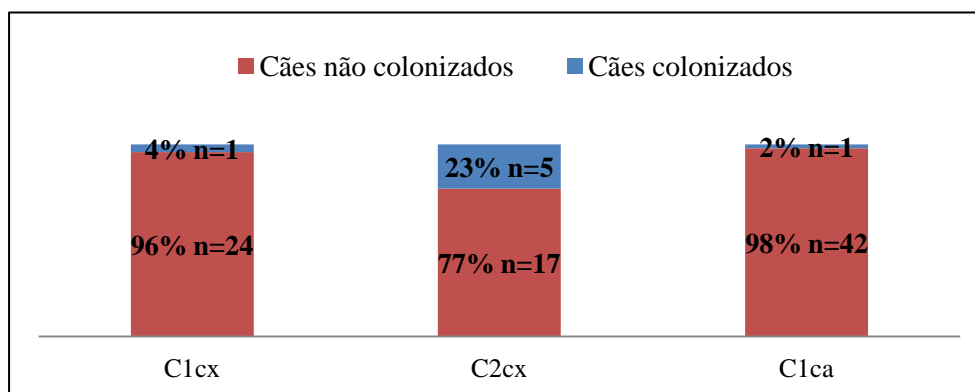
Quanto ao resultado obtido no grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx=73%), a análise estatística demonstrou o aumento significativo de cães colonizados no grupo de cirurgia em C2cx, comparativamente ao grupo de cirurgia em C1cx ($P=0,007$) e ao grupo C1ca ($P=0,017$). Não são conhecidos estudos relativos à colonização nosocomial em cães após o tratamento cirúrgico e permanência no hospital, no que diz respeito às bactérias analisadas neste trabalho. Porém, relativamente a outras bactérias resistentes, como Staphylococci meticilina-resistentes, é evidenciado no estudo de Bergstrom et al. (2012) o aumento significativo ($P<0,001$) de cães colonizados com MRSP após o tratamento cirúrgico (12,8%; 5/45). No entanto, apesar de se tratarem de bactérias resistentes diferentes e animais de um País da Escandinávia, o valor obtido no estudo de Bergstrom et al. (2012) (12,8%) foi bastante inferior ao obtido no presente trabalho (73%).

Nos humanos têm sido feitos alguns estudos de forma a perceber o grau de colonização com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração. Como por exemplo o estudo de Nordberg et al. (2013), realizado em neonatos internados na unidade de cuidados intensivos de um Hospital no Equador e no qual foram detectados 56% de neonatos colonizados com Enterobacteriaceae produtoras de ESBL. O estudo de Girlich, Poiriel, Benouda & Nordmann (2013) demonstrou também uma elevada percentagem (42,85%) de pacientes, internados num Hospital de Marrocos, colonizados com Enterobacteriaceae produtoras de ESBL. Assim, tal como se verificou no presente trabalho, a colonização nosocomial com bactérias resistentes é uma realidade, tanto em medicina veterinária como em medicina humana.

4.2- Colonização por bactérias resistentes aos carbapenemos

No que diz respeito ao número de cães colonizados com bactérias resistentes ao meropenem, carbapenemo colocado no meio de onde foram isoladas, verificou-se que no grupo de cirurgia em C1cx 4% (1/25) dos cães estavam colonizados, em C2cx 23% (5/22) e no grupo C1ca a colonização foi de 2% (1/43) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Cães colonizados com bactérias resistentes aos carbapenemos (meropenem).



Verificou-se apenas um ligeiro aumento nos cães pertencentes ao grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx - 23%) e foi detectado apenas um cão colonizado nos restantes dois grupos (C1cx e C1ca).

Não são conhecidos estudos relativos à colonização nosocomial, ou não, de cães com bactérias Gram negativas resistentes aos carbapenemos. No entanto, no homem existem vários relatos de colonização por bactérias produtoras de carbapenemases. Como por exemplo, o estudo de Nordmann et al. (2013), no qual são analisados 77 pacientes hospitalizados num Hospital Universitário de Marrocos e a prevalência de bactérias produtoras de carbapenemases (*bla_{OXA-48}*) foi de 12,8% (10/77 amostras). Tendo em conta a diferença dos dois estudos, o valor obtido de colonização nosocomial no presente trabalho (C2cx - 23%) comparado com o valor obtido no estudo de Nordmann et al. (2013) (12,8%) é bastante superior, embora o número de animais analisados (C2cx – 22) seja menor. Do mesmo modo, o estudo de Li et al. (2014), realizado num Hospital Universitário na China, também demonstrou valores de colonização com Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases relativamente baixos (6,6%, 20/303 pacientes), comparativamente com o valor obtido no presente trabalho (C2cx - 23%). Por outro lado, o estudo de Perry et al. (2011), realizado num Hospital Militar no Paquistão, apresenta valores de colonização superiores. Assim, nesse estudo de 200 amostras recolhidas de 70 pacientes hospitalizados e 130 não hospitalizados, obteve-se no total 18,5% (37/200 pacientes) de pacientes colonizados com bactérias (Enterobacteriaceae) produtoras de carbapenemases, nos pacientes não hospitalizados a prevalência foi menor (13,8%; 18/130), ao contrário do que se verificou nos pacientes hospitalizados (27,1%; 19/70).

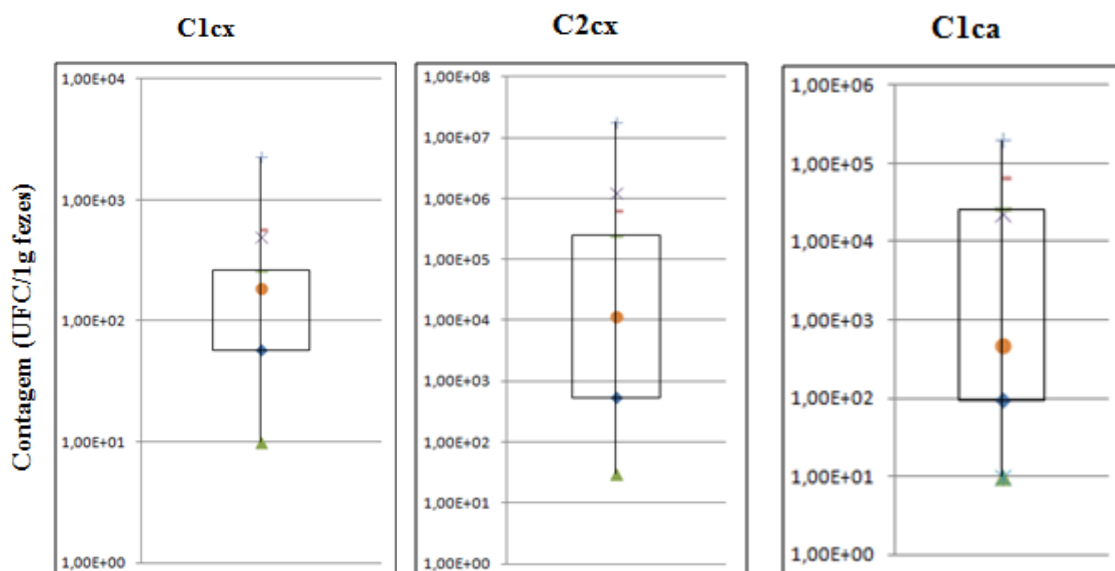
No que diz respeito à colonização com bactérias resistentes produtoras de carbapenemases em humanos saudáveis, foi publicado um estudo de Ruppé et al. (2014) no qual foram analisados 57 viajantes saudáveis vindos da Índia (onde não tiveram qualquer tipo de contacto com centros hospitalares) para França. Neste estudo foram detectados 3 viajantes (5,3%; 3/57) colonizados com bactérias da família Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases. No presente trabalho e tendo em conta a diferença dos dois estudos quanto à espécie da população em estudo, foram detectados 4% de cães colonizados no grupo de cirurgia antes da cirurgia (C1cx) e se identificarmos este grupo como representante da presença ou ausência de colonização na comunidade, podemos comparar com o valor obtido no estudo de Ruppé et al. (2014) em humanos saudáveis (5,3%) e verificar que o valor é muito semelhante ao obtido no presente trabalho (4%).

4.3 – Quantificação da colonização por bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e carbapenemos

A contagem de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima), foi significativamente superior no grupo de cirurgia em C2cx comparativamente ao C1cx ($P=0,004$) e com o grupo C1ca ($P<0,0001$). As contagens foram também significativamente superiores no grupo C1ca relativamente ao grupo de cirurgia em C1cx ($P=0.0006$).

No grupo de cirurgia antes da cirurgia (C1cx, 6 cães colonizados em 25) as contagens variaram entre 1×10^1 e $2,25 \times 10^3$ UFC/1g fezes e a média foi de $4,88 \times 10^2$ UFC/1g fezes e após a cirurgia (C2cx, 16 cães colonizados em 22) as contagens variaram entre 3×10^1 e $1,8 \times 10^7$ UFC/1g fezes e a média foi de $1,25 \times 10^6$ UFC/1g fezes (Figua 17, Anexo IX – Gráficos 3 e 4). No grupo de controlo do ambiente (C1ca, 18 cães colonizados em 43) as contagens variaram entre 1×10^1 e $1,97 \times 10^5$ UFC/1g fezes e a média de contagens foi de $2,28 \times 10^4$ UFC/1g fezes (Figua 17, Anexo IX – Gráfico 5).

Figura 17 - Quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima) no grupo de cirurgia antes da cirurgia (C1cx, 6 cães colonizados em 25), no grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx, 16 cães colonizados em 22) e no grupo de controlo do ambiente (C1ca, 18 cães colonizados em 43).



A contagem de bactérias resistentes aos carbapenemos (meropenem) foi significativamente inferior, mas ainda assim verificaram-se contagens mais altas no grupo de cirurgia em C2cx.

No grupo de cirurgia antes da cirurgia (C1cx, 1 cão em 25) o único animal colonizado apresentou a contagem $1,3 \times 10^2$ UFC/1g fezes e após a cirurgia (C2cx, 5 cães colonizados em 22) as contagens variaram entre 3×10^1 e $1,8 \times 10^3$ UFC/1g fezes, sendo a média de $8,06 \times 10^2$ UFC/1g fezes (Anexo IX – Gráfico 6). No grupo de controlo do ambiente (C1ca, 1 cão em 43) foi detectado apenas um cão colonizado com a contagem de 1×10^1 UFC/1g fezes.

Até ao momento não são conhecidos estudos relativos à quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e aos carbapenemos em cães e poucos são os estudos feitos nos humanos. O estudo de Nordmann et al. (2013) faz referência à carga fecal de bactérias da família Enterobacteriaceae produtoras de ESBL e de carbapenemases em pacientes hospitalizados num Hospital Universitário de Marrocos. Nesse estudo as contagens de bactérias produtoras de ESBL variam de 2×10^2 a $>1 \times 10^8$ UFC/1g fezes e quanto às bactérias produtoras de carbapenemases as contagens variam de 4×10^2 a $>1 \times 10^8$ UFC/1g fezes, valores bastante superiores aos obtidos no presente trabalho.

4.4- Resultados obtidos em ambos os grupos quanto às bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e aos carbapenemos

Tabela 9 - Bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração - resultados obtidos em ambos os grupos, quanto à classificação, filogenia *E. coli*, padrão de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sinergia positiva e genes de resistência detectados.

Grupo	Id	Estirpe	Classificação	Filogenia <i>E. coli</i>	Padrão de Resistências aos antibióticos β -lactâmicos	Sinergia positiva	Genes de resistência
C1cx	JC1	JC1 C1 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
	JC2	JC2 C1 ctx	<i>E. coli</i>	D	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC4	JC4 C1 ctx	outra NF	N/A	N/E	Não	N/E
	JC14	JC14 C1 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{SHV}
	JC18	JC18 C1 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC20	JC20 C1 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	Não	N/E
C2cx	JC1	JC1 C2 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
	JC2	JC2 C2 ctx	<i>E. coli</i>	D	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC3	JC3 1 C2 ctx	<i>E. coli</i>	D	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
		JC3 2 C2 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
		JC3 3 tipo1 C2 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}
		JC3 3 tipo2 C2 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
	JC4	JC4 C2 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	Não	N/E
	JC6	JC6 C2 ctx	outra NF	N/A	CAZ	Não	N/E
	JC7	JC7 C2 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC8	JC8 1 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	N/E	Não	N/E
		JC8 2 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	N/E	Não	N/E

	JC9	JC9 C2 ctx	<i>E. coli</i>	B2	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
	JC11	JC11 C2 ctx	<i>E. coli</i>	A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
	JC12	JC12 C2 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JC13	JC13 C2 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{SHV}
	JC15	JC15 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	N/E	Não	N/E
	JC16	JC16 C2 ctx	<i>E. coli</i>	A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC17	JC17 C2 ctx	<i>E. coli</i>	A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC21	JC21 C2 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JC25	JC25 1 C2 ctx	<i>E. coli</i>	A	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
		JC25 2 C2 ctx	outra NF	N/A	N/E	Não	N/E
C1ca	JS4	JS4 ctx	<i>E. coli</i>	B2	AMP, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}
	JS8	JS8a ctx	<i>E. coli</i>	D	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY-2}
		JS8b ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY-2}
	JS11	JS11 ctx	outra NF	N/A	N/E	Não	N/E
	JS12	JS12 ctx	outra NF	N/A	N/E	Não	N/E
	JS16	JS16a ctx	outra NF	N/A	N/E	Não	N/E
		JS16b ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
	JS17	JS17 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JS18	JS18 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JS19	JS19 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JS20	JS20 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JS21	JS21 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JS24	JS24 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JS25	JS25 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JS26	JS26 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JS33	JS33 ctx	<i>E. coli</i>	D	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JS35	JS35 ctx	outra NF	N/A	N/E	Não	N/E
	JS36	JS36 ctx	<i>E. coli</i>	D	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JS38	JS38 ctx	outra F	N/A	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}

	JS40	JS40 ctx	<i>E. coli</i>	B1	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
--	------	----------	----------------	----	-----------------------------	-----	-----

Legenda: F – Bactéria fermentadora, NF – Bactéria não fermentadora, N/A – nada a assinalar, N/E – nenhum.

Tabela 10 - Bactérias resistentes aos carbapenemos - resultados obtidos em ambos os grupos, quanto à oxidase, classificação, identificação (Api 20NE e Api 20E), padrão de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sinergia positiva e genes de resistência detectados.

Grupo	Id	Estirpe	Oxidase	Classificação	Api 20 NE	Api 20 E	Padrão de Resistências aos antibióticos β -lactâmicos	Sinergia positiva	Genes de resistência
C1cx	JC4	JC4 C1 mem	Positiva	outra NF	<i>Ralstonia piccketti</i> 85,0%	N/A	ATM	Não	N/E
C2cx	JC4	JC4 C2 mem	Negativa	outra F	N/A	<i>Enterobacter aerogenes</i> 57,2%	CAZ, ETP, ATM, TZP	Não	N/E
	JC8	JC8 1 C2 mem	Positiva	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99,4%	N/A	IMP	Não	N/E
		JC8 2 C2 mem	Positiva	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 99,9%	N/A	IMP	Não	N/E
	JC15	JC15 C2 mem	Positiva	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 98,3%	N/A	IMP	Não	N/E
	JC21	JC21 C2 mem	Positiva	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas putida</i> 86,0%	N/A	N/E	Não	N/E
	JC25	JC25 C2 mem	Negativa	outra NF	N/A	N/I	ATM, TZP	Não	N/E
C1ca	JS23	JS23 mem	Positiva	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Burkholderia cepacia</i> 98,8%	N/A	N/E	Não	<i>bla</i> _{CTX-M}

Legenda: F – Bactéria fermentadora, NF – Bactéria não fermentadora, N/A – nada a assinalar, N/E – nenhum, N/I – não identificado.

4.4.1- Identificação do género/espécie de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e carbapenemos

Para cada grupo foi realizada a classificação das bactérias de Gram negativo resistentes às cefalosporinas de 3ª geração isoladas (Tabela 9, Anexo IX – Gráfico 1). No grupo de cirurgia em C1cx obtiveram-se 6 estirpes bacterianas: 4 (67%) *E. coli*, 1 (17%) classificada como outra bactéria fermentadora (outra F) e 1 (17%) como outra bactéria não fermentadora (outra NF). No grupo de cirurgia em C2cx obtiveram-se 21 estirpes bacterianas: 10 (48%) *E. coli*, 6 (29%) classificadas como outra F, 3 (14%) *Pseudomonas* spp. e 2 (10%) como outra NF. Por fim, no grupo C1ca obtiveram-se 20 estirpes bacterianas: 15 (75%) *E. coli*, 4 (20%) outra NF e 1 (5%) outra F. Esta classificação permitiu observar uma maior variedade de bactérias nos cães após a cirurgia (em C2cx). Neste grupo foram isolados quatro tipos de bactérias resistentes, enquanto nos cães antes da cirurgia (em C1cx) e no grupo C1ca foram isolados três tipos de bactérias resistentes. Os isolados do género *Pseudomonas* spp. foram apenas observados no grupo de cirurgia em C2cx. Uma hipótese para a sua presença apenas nos cães após a cirurgia (em C2cx) é o facto de se tratar de bactérias intrinsecamente resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico, assim como à cefotaxima (Leclercq et al., 2011). Assim, uma vez que os cães pertencentes a este grupo estiveram sujeitos à pressão selectiva exercida pela administração profilática destes antibióticos, aumentou o seu número no TGI, o que fez com que a probabilidade de isolamento nas amostras fecais recolhidas fosse maior.

Para as bactérias resistentes aos carbapenemos foi realizada a sua identificação pelo sistema Api, como presente na Tabela 10.

4.4.2- Determinação Filogrupos de *E. coli*

Para além da identificação das estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração da espécie *Escherichia coli*, foi também determinada a sua filogenia (Tabela 12, Anexo IX – Gráfico 2). No grupo de cirurgia em C1cx foram identificadas três estirpes de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B1 e uma pertencente ao grupo D. No grupo de cirurgia em C2cx verificou-se uma maior variedade: quatro pertencentes ao grupo A, três do grupo B1, duas do grupo D e uma do grupo B2. Por fim, no grupo C1ca 11 estirpes de *E. coli* pertenciam ao grupo B1, três ao grupo D e uma estirpe ao grupo B2.

A classificação filogenética das bactérias *E. coli* resistentes às cefalosporinas de 3ª geração permitiu verificar quais os grupos filogenéticos mais prevalentes, se as estirpes virulentas B2 e D (esta última seja menos virulenta), ou as estirpes comensais A e B1 (Clermont et al., 2000). Desta forma, foi possível observar a presença de todos os grupos filogenéticos em *E.*

coli isoladas nos cães pertencentes ao grupo de cirurgia em C2cx: 10% B2 (1/10), 20% D (2/10), 30% B1 (3/10) e 40% A (4/10) e em C1cx: 25% D (1/4) e 75% B1 (3/4). Nas estirpes isoladas nos cães do grupo C1ca: 7% B2 (1/15), 20% D (3/15) e 73% B1 (11/15). A estirpe comensal A não foi observada em *E. coli* isoladas nos animais pertencentes ao grupo C1ca e ao grupo de cirurgia em C1cx. No presente trabalho os grupos filogenéticos de *E. coli* mais prevalentes foram os comensais, no entanto, embora menos prevalente, é muito preocupante a detecção de estirpes de *E. coli* resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e simultaneamente com características de virulência, no caso das estirpes pertencentes aos grupos B2 e D.

No estudo de Schmiedel et al. (2014) são referidos os grupos filogenéticos de *E. coli* produtoras de ESBL de amostras humanas e de animais, recolhidas num hospital e numa clínica veterinária, respectivamente. Nos humanos, o grupo filogenético mais prevalente foi o A (30,5%), seguido pelo B1 (27,7%), B2 (26,2%) e menos prevalente o grupo D (15,6%). Nos animais, os grupos mais prevalentes foram também o grupo A (43,7%) e o grupo B1 (35,7%) e ao contrário do que se verificou nos humanos, o grupo menos prevalente foi o B2 (2,4%), o qual se seguiu ao grupo D (17,5%). Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, nomeadamente com as amostras dos cães pertencentes ao grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx), os resultados estão de acordo, pois o grupo filogenético mais prevalente foi também o grupo A (40%), seguido do grupo B1 (30%) e menos prevalente o grupo B2 (10%). Pelo contrário, no mesmo grupo de cirurgia mas antes da cirurgia (C1cx) e no grupo C1ca, o grupo filogenético A não foi identificado, porém o grupo mais prevalente em ambos foi o B1, seguido também pelo grupo D.

Contrariamente ao obtido no estudo de Schmiedel et al. (2014), Valenza et al. (2014) após análise de amostras de *E. coli* produtoras de ESBL, oriundas de humanos da comunidade Alemã, verificou também que o grupo filogenético mais prevalente era o A (40,3%), mas neste caso seguido pelo grupo D (38,4%).

No caso de se tratarem de *E. coli* isoladas de animais com Infecção do Trato Urinário, os resultados publicados quanto ao grupo filogenético são bastante diferentes. Como por exemplo, no estudo de Tramuta, Nucerez, Robino, Salvarani & Nebbia (2010) realizado num Hospital Veterinário Escolar em Itália, em que foram analisadas amostras de *E. coli* uropatogénicas obtidas de cães e gatos com cistite. Verificou-se que o grupo filogenético mais prevalente foi o grupo B2 (65%), seguido pelo grupo B1 (15%) e D (10%) e menos prevalente o grupo A (10%). Outro estudo, realizado no Brasil por Osugui, Castro, Iovine, Irino & Carvalho (2014), demonstrou resultados muito semelhantes ao de Tramuta et al (2010). Assim, 62% das bactérias uropatogénicas *E. coli* pertenciam ao grupo filogenético B2, 18% ao grupo B1, 16% ao grupo D e, por fim, 4% ao grupo A.

4.4.3- Determinação da susceptibilidade aos antibióticos β -lactâmicos

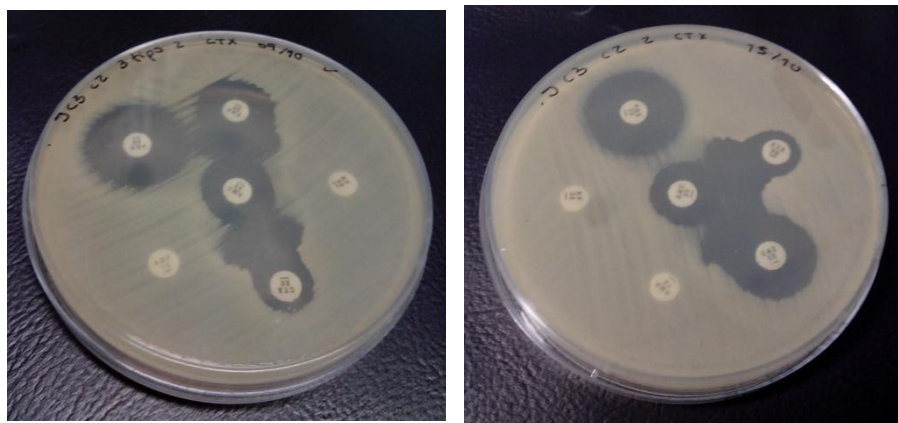
Obtiveram-se vários perfis de resistência aos antibióticos β -lactâmicos pelo método de difusão de discos (Anexos VII, VIII).

No que diz respeito às estirpes de *E. coli* e de outras bactérias fermentadoras resistentes às cefalosporinas de 3^a geração, no grupo de cirurgia em C1cx foram observados quatro perfis de resistência e em C2cx seis perfis de resistência, e no grupo C1ca três perfis de resistência (Tabela 9; Anexo IX – Tabela 1).

No que diz respeito aos isolados de *Pseudomonas* spp. e de outras bactérias não fermentadoras resistentes às cefalosporinas de 3^a geração, só foi observado um perfil de resistência numa estirpe pertencente ao grupo de cirurgia em C2cx, a qual foi resistente à ceftazidima.

Em relação ao DDST, foram observadas sinergias positivas entre a cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico nas estirpes de *E. coli* e nas outras bactérias fermentadoras isoladas (Figura 18). No grupo de cirurgia, em C1cx foram identificados duas estirpes (2/5) com sinergia positiva, em C2cx sete estirpes (7/16) e no grupo C1ca três estirpes (3/16).

Figura 18 - Observação de sinergias pelo DDST, entre os discos de cefotaxima e amoxicilina/ácido clavulânico, em placas de agar Mueller Hinton.



No que diz respeito às estirpes de bactérias resistentes aos carbapenemos, como se pode verificar na Tabela 10, apesar do crescimento no meio com meropenem, nenhuma destas estirpes foi resistente a este antibacteriano. Das oito amostras isoladas, apenas duas mostraram susceptibilidade intermédia ao meropenem (JC15 C2 mem e JS23 mem) e nenhuma delas apresentou sinergia positiva.

4.4.4- Determinação do mecanismo molecular de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

No que diz respeito às reacções de PCR realizadas para detecção de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, irão ser apresentados em primeiro lugar os resultados relativos às amostras de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração.

No PCR CTX-M foram positivas as seguintes estirpes: no grupo de cirurgia em C1cx uma estirpe (16,7%, 1/6), em C2cx seis estirpes (28,6%, 6/21) e no grupo C1ca três estirpes (14,3%, 3/20) (Tabela 9, Anexo IX – Tabela 2). Em todos estes isolados foi observada sinergia positiva no DDST.

Por PCR *multiplex* β -lactamases foram detectados nas estirpes (pertencentes à família das Enterobacteriaceae) dos vários grupos os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXA-1}: no grupo de cirurgia em C1cx duas estirpes produtores de TEM (33,3%; 2/6) e uma produtora de SHV (16,7%; 1/6); em C2cx dez estirpes produtoras de TEM (47,6%; 10/21), um isolado produtor de SHV (4,8%; 1/21) e quatro produtores de OXA-1 (19%; 4/21) e por fim no grupo C1ca foram detectadas dez estirpes produtoras de TEM (50%; 10/20) (Tabela 9, Anexo IX –Tabela 3).

Em todas as estirpes produtoras do gene *bla*_{SHV} foi observada sinergia positiva no DDST.

Verificou-se a produção de várias β -lactamases em simultâneo em algumas estirpes, inclusive em estirpes produtoras da ESBL da família CTX-M codificada pelo gene *bla*_{CTX-M} (Tabela 9, Anexo IX – Tabela 3).

Em PCR *multiplex* para detecção de genes *bla*_{AMPC}, dos vários genes de resistência pesquisados, *bla*_{MOX-1}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{MIR}, *bla*_{ACT-1} e *bla*_{FOX-5}, foi detectado apenas o gene *bla*_{CMY-2} em duas estirpes pertencentes ao grupo C1ca (10%; 2/20) (Tabela 9, Anexo IX – Tabela 4). Verificou-se a produção simultânea das β -lactamases CMY-2 e TEM codificadas respectivamente pelos genes *bla*_{CMY-2} e *bla*_{TEM} (Tabela 9, Anexo IX – Tabela 4).

Não foi detectado nenhum dos genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos pesquisados em várias estirpes (Tabela 9, Anexo IX – Tabela 5).

No grupo de cirurgia em C1cx não foram identificados genes de resistência em duas estirpes (33,3%; 2/6), em C2cx e no grupo C1ca em oito estirpes (38,1%, 8/21; 40%, 8/20, respectivamente). Não foi observada sinergia positiva no DDST para nenhum deles.

Para as estirpes resistentes aos carbapenemos foram realizados os mesmos protocolos de PCR feitos para as bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e ainda três PCR *multiplex*

para detecção de carbapenemases. No entanto, não foram detectados genes que codificam para carbapenemases, nem para AmpCs. Por PCR *multiplex* para detecção de genes que codificam para β -lactamases também não foram detectados genes de resistência, mas por PCR CTX-M foi detectada uma estirpe codificadora de ESBL, pertencente ao grupo C1ca (JS23 mem) (Tabela 10).

4.4.5- Fenótipo e genótipo de estirpes resistentes aos antibióticos β -lactâmicos

Com este trabalho foi possível observar a presença de bactérias produtoras do mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos mais comum – a produção de β -lactamases (Tafur et al., 2008; Bush & Jacoby, 2009; Hordijk et al., 2013), em particular de β -lactamases que conferem resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (ESBL). No entanto, em alguns casos não foi possível identificar qual o mecanismo de resistência responsável pelo fenótipo de resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Nestes casos as hipóteses colocadas foram: um mecanismo de resistência adquirido, como mutações nas β -lactamases cromossômicas (Thomson 2010; Bush & Jacoby, 2009) ou outro, que não a produção de β -lactamases (alteração da permeabilidade da membrana externa, aumento da expressão das bombas de efluxo etc), e um mecanismo de resistência intrínseco.

No que diz respeito às estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração no grupo de cirurgia em C1cx foi possível identificar: duas estirpes (JC1 C1 ctx e JC14 C1 ctx) produtoras de ESBL (CTX-M ou SHV), duas estirpes (JC2 C1 ctx e JC18 C1 ctx) produtoras de uma ESBL (TEM>2) ou de uma β -lactamase de largo espectro (*Broad Spectrum* [BS]) (TEM-1) e simultaneamente portadoras de outro mecanismo de resistência não identificado, e ainda duas estirpes (JC4 C1 ctx e JC20 C1 ctx) portadoras de outro mecanismo de resistência não identificado (Tabela 11).

Tabela 11 - Classificação, perfil de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sinergia positiva e genes detectados em C1cx e em C2cx (estirpes produtoras de ESBL, β -lactamase TEM e β -lactamase BS OXA-1).

Grupo	Código amostra	Classificação	Perfil de Resistências aos β -lactâmicos	Sinergia positiva	Genes detectados
C1cx	JC1 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
	JC2 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC4 C1 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E

	JC14 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{SHV}
	JC18 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC20 C1 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	Não	N/E
C2cx	JC1 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA}
	JC3 2 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA}
	JC3 3 tipo1 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} ,
	JC3 3 tipo2 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA}
	JC9 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
	JC13 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{SHV}
	JC25 1 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}

Legenda: F- Bactéria fermentadora, NF – Bactéria não fermentadora, N/A – nada a assinalar,
N/E - nenhum

Para distinguir as β -lactamases TEM entre ESBL e β -lactamase BS seria necessário fazer a sequenciação do gene *bla*_{TEM}, o que não foi realizado neste trabalho. A TEM-1 tem a capacidade de hidrolizar apenas as aminopenicilinas, como a ampicilina, mas quando hiperproduzida hidroliza também a amoxicilina com ácido clavulânico e a cefalotina, enquanto as β -lactamases TEM-2 ou derivados desta apresentam as características de ESBL. As ESBLs do tipo CTX-M identificadas neste trabalho foram susceptíveis à cefoxitina e à amoxicilina com ácido clavulânico e resistentes às cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações, mas são susceptíveis à ceftazidima (cefalosporina de 3ª geração) (Tabela 11). Sabe-se que as ESBLs são resistentes a uma ou mais oximino-cefalosporinas e que a maior parte, mas nem todas, das enzimas do tipo CTX-M hidrolizam a cefotaxima mais eficazmente que a ceftazidima (Bush & Jacoby, 2009).

A SHV é considerada uma ESBL, pois tem a capacidade de hidrolisar uma ou mais oximino-cefalosporinas (cefotaxima e ceftazidima), sendo assim considerada como SHV>2, derivada de SHV mas com actividade hidrolítica para as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (Tabela 11) (Bush & Jacoby, 2009). Caso uma estirpe seja susceptível às oximino-cefalosporinas será

considerada uma β -lactamase BS (SHV-1), que apresenta um espectro de actividade mais reduzido e não de espectro alargado (ESBL).

A sinergia positiva quando observada confirma uma estirpe ser produtora de ESBLs – CTX-M ou SHV>2 (Tabela 11).

Foram isoladas duas estirpes (amostras JC2 C1 ctx e JC18 C1 ctx) produtoras de uma TEM (ESBL -TEM>2 ou β -lactamase BS -TEM-1) e portadoras de outro mecanismo de resistência, o qual pode tratar-se de uma mutação nas AmpC cromossómicas - β -lactamases presentes em todas as bactérias da espécie *E. coli* (Tabela 11). Muitas bactérias de Gram negativo produzem AmpCs cromossomais, embora com expressão baixa. No entanto, pode ser induzida quando há exposição a certos antibióticos β -lactâmicos como: amoxicilina, ampicilina, ácido clavulânico e imipenem (Bush & Jacoby, 2009). Desta forma, podem ocorrer mutações espontâneas nos genes que regulam a produção de AmpCs, o que leva a uma produção constitutiva destas enzimas em quantidades suficientes para que ocorra hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos (Tafur et al., 2008; Thomson, 2010). Por esta razão, a hidrólise observada de todos os antibióticos β -lactâmicos testados, sem terem sido detectadas AmpC plasmídicas, indica a presença de uma AmpC cromossómica visto se tratar da espécie *E. coli*.

A estirpe isolada da amostra JC4 C1 ctx não apresentou nenhum perfil de resistência aos antibióticos β -lactâmicos testados (Tabela 11), sendo seleccionada devido à sua resistência intrínseca ao CTX (Leclercq et al., 2011). Por sua vez, na estirpe isolada a partir da amostra JC20 C1 ctx não foi detectado nenhum gene de resistência. No entanto, esta estirpe apresenta um perfil de resistência sugestivo da presença de outro mecanismo de resistência (Tabela 11). Trata-se de uma bactéria fermentadora não pertencente à espécie *E. coli*, pelo que o mecanismo de resistência envolvido pode ser a mutação nas AmpCs cromossómicas, caso não se trate de uma bactéria que naturalmente não produza AmpC cromossómicas, como as bactérias do género *Klebsiella* spp. (Thomson, 2010). Caso a bactéria isolada não tenha a capacidade de produzir AmpCs cromossómicas, tratar-se-á de outro mecanismo que não a produção de β -lactamases.

No que diz respeito às estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração no grupo de cirurgia em C2cx foi possível identificar três estirpes produtoras de ESBL (CTX-M ou SHV>2) (JC9 C2 ctx, JC13 C2 ctx e JC25 1 C2 ctx) (Tabela 11).

Em quatro isolados (JC1 C2 ctx, JC3 2 C2 ctx, JC3 3 tipo1 C2 ctx e JC3 3 tipo2 C2 ctx), foram identificadas estirpes produtoras de ESBL do tipo CTX-M simultaneamente com a produção de β -lactamase TEM e de β -lactamase BS OXA-1 (Tabela 11).

As β -lactamases do tipo OXA-1 são também consideradas β -lactamase BS, porque têm apenas a capacidade de hidrolizar AMP, como as TEM-1, e ainda AMC. Assim, em três isolados (JC1 C2 ctx, JC3 2 C2 ctx e JC3 3 tipo2 C2), a resistência a AMC deve-se à presença de OXA-1, enquanto a susceptibilidade a FOX e a sinergia positiva são devido à presença de CTX-M.

A estirpe isolada da amostra JC3 3 tipo1 C2 ctx tem a capacidade de hidrolizar FOX o que não pode ser explicado pela presença de CTX-M, mas sim pela hiperprodução de TEM, o que também justificaria a resistência a AMC. Porém, caso a bactéria em causa tenha a capacidade de produzir AmpCs cromossômicas, esta também poderia ser a resposta à resistência a todos os antibióticos testados.

Podem ser observadas na Tabela 12 os seis isolados pertencentes ao grupo C2cx (JC2 C2 ctx, JC3 1 C2 ctx, JC7 C2 ctx, JC11 C2 ctx, JC16 C2 ctx e JC17 C2 ctx) produtoras de TEM e/ou de OXA-1 (β -lactamase BS) e simultaneamente portadoras de outro mecanismo de resistência, a produção de AmpC cromossômicas, uma vez que todas correspondem a bactérias da espécie *E. coli* e o seu perfil de resistência inclui todos os antibióticos testados.

Tabela 12 - Classificação, perfil de resistência, sinergia positiva e genes detectados de estirpes pertencentes ao grupo C2cx, concretamente estirpes produtoras de TEM e/ou de OXA-1 e simultaneamente portadoras de outro mecanismo de resistência, e estirpes pertencentes ao grupo C1ca, concretamente estirpes produtoras de ESBLs simultaneamente de TEM e de outro mecanismo de resistência não identificado.

Grupo	Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência	Sinergia Positiva	Genes detectados
C2cx	JC2 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC3 1 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC7 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC11 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA}
	JC16 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
	JC17 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
C1ca	JS16b ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
	JS38 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M}
	JS4 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX, CAZ	Sim	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}

Legenda: F – Bactéria fermentadora

Por fim, não foi detectado nenhum gene de resistência em oito estirpes isoladas (Anexo IX – Tabela 6).

As amostras classificadas como *Pseudomonas* spp. (Anexo IX – Tabela 6) não apresentaram nenhum perfil de resistência aos antibióticos β -lactâmicos testados, sendo selecionadas no nosso estudo devido à sua resistência intrínseca à cefotaxima. No entanto, houve uma estirpe (JC6 C2 ctx) resistente à ceftazidima, o que se deve muito provavelmente a mutações ocorridas nas AmpCs cromossômicas, pois o género *Pseudomonas* spp. tem a capacidade de as produzir naturalmente (Thomson, 2010). Relativamente a *E. coli* (amostra JC21 C2 ctx) e às bactérias classificadas como outras Fermentadoras (amostras JC4 C2 ctx e JC12 C2 ctx), o seu perfil de resistência deve-se, muito provavelmente, a mutações nas AmpCs cromossômicas. Esta hipótese foi excluída nos isolados que pertencem a géneros não produtores de AmpCs cromossômicas, tais como *Klebsiella* spp.

Ainda relativamente às estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, no grupo C1ca foi possível identificar uma estirpe (amostra JS16b ctx) produtora de apenas uma ESBL (CTX-M), uma estirpe (amostra JS38 ctx) produtora de CTX-M e de outro mecanismo de resistência (AmpC cromossômica, caso não se trate de uma bactéria não produtora de AmpCs cromossômicas) e uma estirpe (amostra JS4 ctx) também produtora de CTX-M e simultaneamente de TEM (Tabela 12).

Foram detectadas duas estirpes de *E. coli* produtoras AmpCs plasmídicas do tipo CMY-2, as quais conferem resistência a todos os antibióticos testados (Tabela 13). Estas bactérias apresentaram a produção simultânea de TEM.

Tabela 13 - Estirpes isoladas da espécie *E. coli* produtoras de AmpCs plasmídicas do tipo CMY-2 no grupo C1ca.

Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência	Sinergia Positiva	Genes detectados
JS8a ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY-2}
JS8b ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CMY-2}

Foi observado um perfil de resistência comum em onze isolados da espécie *E. coli*, as quais têm a capacidade de hidrolizar todos os antibióticos testados (Anexo IX - Tabela 9). Este perfil pode ser justificado por uma mutação nas AmpCs cromossômicas naturalmente presentes nesta espécie. Nestas onze estirpes foi detectada a produção simultânea da β -lactamase TEM em sete bactérias isoladas.

Não foram detectados genes de resistência, nem perfis de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em quatro estirpes de bactérias classificadas como não fermentadoras (Anexo IX – Tabela 7). A sua selecção deve-se, muito provavelmente, à sua resistência intrínseca à cefotaxima.

Após a análise dos mecanismos de resistência presentes nas bactérias isoladas resistentes às cefalosporinas de 3ª geração nos dois grupos (grupo C1cx e C2cx e grupo C1ca), foi possível observar que a média de β -lactamases produzida pelas estirpes produtoras destas enzimas foi cerca de duas vezes superior no grupo de cirurgia em C2cx.

Até aqui foram discutidos os resultados obtidos para as bactérias resistentes às cefalosporinas da 3ª geração, faltando apenas perceber quais os mecanismos de resistência presentes nas bactérias isoladas resistentes aos carbapenemos.

Pelos testes genotípicos (PCR) não foram detectadas Carbapenemases, nem AmpCs plasmídicas, sendo apenas identificada uma bactéria (*Burkholderia cepacia*) produtora de uma ESBP (CTX-M) num cão pertencente ao grupo C1ca.

No que diz respeito aos três isolados de bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* obtidos a partir de amostras fecais de dois cães pertencentes ao grupo de cirurgia após a cirurgia (em C2cx), apenas numa (amostra JC15 C2 mem) foi possível identificar qual o provável mecanismo de resistência responsável pela resistência apresentada ao IMP e a susceptibilidade intermédia ao MEM (Tabela 14). Assim, com base nos critérios encontrados na Tabela 14, é possível verificar que a resistência apresentada ao IMP se deve a outro mecanismo que não a produção de β -lactamases, a diminuição do número e/ou do tamanho das porinas OprD. Sabe-se que na espécie *P. aeruginosa* os carbapenemos, como o imipenem e o meropenem, utilizam uma porina específica, a OprD. Em consequência, alterações nesta porina conduzem à resistência ao meropenem e/ou imipenem. No entanto, o meropenem é menos dependente da passagem por esta porina que o imipenem. Assim, algumas estirpes resistentes ao imipenem podem permanecer sensíveis ao meropenem (Tafur et al., 2008). Este facto pode também estar na origem da resistência das restantes estirpes de *P.aeruginosa* (JC8 1 C2 mem e JC8 2 C2 mem) ao IMP.

Tabela 14 - Antibiógrama e o provável mecanismo implicado na resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenemos (Grosso, 2014), juntamente com o padrão fenotípico das estirpes identificadas como *P. aeruginosa*.

Código amostra	Identificação	Antibióticos β -lactâmicos					Provável Mecanismo de Resistência implicado
		TZP	CAZ	ATM	IMP	MEM	
JC15 C2 mem	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	S	R	I	Diminuição do número e tamanho das porinas (OprD)
JC8 1 C2 mem	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	I	R	S	N/I
JC8 2 C2 mem	<i>P.aeruginosa</i>	S	S	S	R	S	N/I

Legenda: S – susceptível, I – susceptibilidade intermédia, R – resistente, N/E – nenhum, N/I – não identificado.

Para as restantes estirpes (Anexo IX – Tabela 8), nenhuma apresentou resistência ao MEM, apesar da estirpe da espécie *Burkholderia cepacia* ter apresentado susceptibilidade intermédia. O mecanismo envolvido na resistência apresentada não foi identificado, deixando em aberto duas hipóteses:

- Caso se trate de um mecanismo de resistência adquirido: a mutação de β -lactamases cromossómicas ou a presença de outro mecanismo de resistência que não a produção de β -lactamases;
- No caso de se tratar de um mecanismo de resistência intrínseco – as informações disponíveis não relatam a presença de carbapenemases intrínsecas nestas espécies (*European Food Safety Authority*, 2013).

A interpretação dos perfis de resistência destas bactérias é também difícil, uma vez que não estão disponíveis critérios específicos para a interpretação dos TSA pelo método de difusão em disco para estas espécies.

4.4.6- Factores de risco responsáveis pela colonização e pelo aumento da carga de bactérias de Gram negativo resistentes

O segundo objectivo deste trabalho foi identificar quais os potenciais factores de risco responsáveis pela colonização e pelo aumento da carga de bactérias de Gram negativo resistentes. Foram analisados estatisticamente apenas os cães com estirpes de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, uma vez que foi bastante menos expressivo o número de cães com estirpes de bactérias resistentes aos carbapenemos.

Com o objectivo de perceber quais os motivos envolvidos na ocorrência de colonização nos grupos de cirurgia em C1cx e C1ca, foram consideradas seis variáveis como potenciais factores de risco: idade, sexo, residente, vive com outros animais, administração de antibacterianos no último ano e hospitalização (internamento) no último ano. Os resultados que se obtiveram estão presentes na Tabela 15

Tabela 15 - Factores de risco e os correspondentes *Odds Ratio* (OR), Intervalo de Confiança (IC) e valores de P para a ocorrência colonização com bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, a partir de regressão logística (C1ca n=43 cães; C1cx n=25 cães; C2cx n=22 cães).

Estirpes	Factor de Risco	OR	IC	P value
Bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração dos grupos C1cx e C1ca	Idade	1,069	0,94 a 1,215	0,309
	Sexo (F vs M)	0,925	0,29 a 2,951	0,895
	Residente (S vs N)	4,294	1,146 a 16,087	0,03
	Vive com outros animais (S vs N)	1,701	0,508 a 5,694	0,389
	Administração de antibacteriano no último ano (S vs N)	2,678	0,542 a 13,231	0,226
	Hospitalização no último ano (S vs N)	4,126	0,819 a 20,772	0,085
Bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração do grupo C2cx	Tipo de cirurgia (Ortopédica vs T. Moles)	0,145	0,007 a 2,803	0,201
	Electiva (N vs S)	15,714	0,936 a 263,887	0,055
	Dias de administração de antibacteriano	1,644	0,768 a 3,518	0,2
Bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração C1ca	Tempo de contacto com a FMV	0,958	0,720 a 1,275	0,769
	Frequência de contacto com a FMV (maior vs menor frequência)	1,615	0,221 a 11,815	0,636

Legenda: F – fêmea, M – macho, S – sim, N – não, vs – *versus*, T. Moles – Tecidos Moles.

Assim, após a análise estatística, a variável “residente” foi estatisticamente significativa, isto é, os cães que contactavam com o ambiente hospitalar no seu dia a dia (cães que pertencentes à equipa hospitalar e académica e os residentes nos canis) têm um elevado risco de estarem colonizados por bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (P=0,03; OR= 4,294; IC 95% 1,146 a 16,087). Este resultado vem de encontro com resultados obtidos em outros estudos, como por exemplo o estudo de Sanchez et al. (2002), no qual foram detectadas bactérias resistentes no ambiente de um Hospital Veterinário. Desta forma, o presente estudo demonstra o facto do ambiente hospitalar poder contribuir para a colonização de animais saudáveis com bactérias resistentes, neste caso, bactérias de Gram negativo resistentes às cefalosporinas de 3ª geração

A variável “hospitalização (internamento) no último ano”, apresenta uma tendência de factor de risco, pois a estimativa *odds ratio* indica que a maioria dos cães colonizados estiveram internados no ano anterior ($P=0,085$; $OR=4,126$; IC 95% 0,819 a 20,772). Embora pouco se saiba em medicina veterinária sobre a influência da hospitalização (internamento) na colonização com bactérias resistentes nos animais, este é um factor de risco bem descrito em medicina humana, como responsável pelo aumento da prevalência de bactérias resistentes aos antibacterianos. Assim, apesar de serem conhecidos alguns estudos relativos à associação da duração da hospitalização e a resistência aos antibacterianos, como o estudo de Ogeer-Gyles et al. (2006), continua a ser essencial o desenvolvimento de novos estudos para que se compreenda qual a influência da hospitalização na prevalência de bactérias resistentes nos animais.

No presente estudo, a variável “administração de antibacteriano no último ano” não foi considerada como potencial factor de risco, uma vez que estatisticamente não foi significativo ($P=0,226$) para a ocorrência de colonização, ao contrário do que foi descrito por outros autores (Belas et al., 2014), o que pode dever-se ao facto de se tratar de uma amostra de pequena dimensão.

As variáveis “idade”, “sexo” e “vive com outros animais” não foram consideradas como potenciais factores de risco, uma vez que estatisticamente não foram significativos ($P=0,309$; $P=0,895$; $P=0,386$ respectivamente) para a ocorrência de colonização.

Para os cães do grupo de cirurgia em C2cx foram analisados estatisticamente três potenciais factores de risco: tipo de cirurgia (Tecidos moles ou Ortopédica), se foi uma cirurgia electiva ou não e os dias de administração de antibacterianos (número de dias que o cão tomou o(s) antibacteriano(s) após a cirurgia, até à realização da colheita da amostra fecal). A variável “dias de hospitalização”, embora descrito na literatura, por exemplo no estudo de Ogeer-Gyles et al. (2006), como potencial factor de risco para a colonização por bactérias resistentes, não foi considerado neste estudo, uma vez que o número de cães hospitalizados após o tratamento ciúrgico (excluindo o recobro) foi muito reduzido. Assim, foi analisada a variável “dias de administração de antibacterianos”, a qual se encontra bem descrita na literatura, por exemplo nos estudos de Belas et al. (2014); EMA, (2013); Wedley et al. (2011) e Costa et al. (2008), como responsável pela colonização com bactérias resistentes e as variáveis “tipo de cirurgia” e “cirurgia electiva ou não”. As duas últimas variáveis estão também descritas na literatura, como por exemplo nos estudos de Nelson (2011) e Arias et al. (2013), como potenciais factores de risco para a ocorrência de infecção nosocomial em medicina veterinária

Nenhum dos factores analisados foi considerado estatisticamente significativo (Tabela 15). No entanto, a variável “cirurgia electiva ou não” apresenta uma forte tendência para ser considerada como factor de risco para a ocorrência de colonização por bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração ($P=0,055$; $OR=15,714$; IC 95% 0,936 a 263,887). Sendo assim, o recurso a uma amostra de maior dimensão poderia estabelecer uma relação estatística entre a ocorrência de colonização e a cirurgia não electiva.

Para os cães do grupo de controlo do ambiente (C1ca) obtiveram-se os resultados presentes na Tabela 15, relativos aos potenciais factores de risco analisados para a ocorrência de colonização nosocomial: tempo de contacto com a FMV ($P=0,769$) e a sua frequência ($P=0,636$). Verificou-se que nenhum deles foi estatisticamente significativo.

Sendo assim, no presente estudo foi identificado como potencial factor de risco para a ocorrência de colonização nosocomial por bactérias de Gram negativo resistentes às cefalosporinas, o factor “residente”.

De seguida foi realizada a análise estatística para determinar potenciais factores de risco associados ao aumento da quantidade de bactérias de Gram negativo resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, a partir do procedimento *General Linear Models* (GLM).

Sendo assim, foram consideradas duas variáveis, como potenciais factores de risco, para o grupo de controlo do ambiente (C1ca): tempo de contacto com a FMV e a frequência de contacto com a FMV (Tabela 16). A definição destas variáveis acenta no facto de estar descrito na literatura que o meio hospitalar é uma fonte de contaminação com bactérias resistentes. Por sua vez, para o grupo de cirurgia após o tratamento cirúrgico (C2cx) foi considerada apenas a variável “dias de administração de antibacterianos” como potencial factor de risco (Tabela 16).

Tabela 16 - Factores de risco e os correspondentes valores de P para o aumento da quantidade de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, a partir do procedimento GLM (C1ca n=43 cães; C2cx n=22 cães).

Estirpes	Factor de Risco	P value
Bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração do grupo C1ca	Tempo de contacto com a FMV	0,001
	Frequência de contacto com a FMV (maior vs menor frequência)	0,664
Bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração do grupo C2cx	Dias de administração de antibacterianos	0,492

Legenda: FMV – Faculdade de Medicina Veterinária, vs – *versus*.

Assim, no que diz respeito à quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração em C2cx, a análise da possível relação entre o número de dias de administração de antibacterianos e a quantidade de bactérias não foi considerado estatisticamente significativo ($P=0,492$) (Tabela 19). Este facto vem de certa forma contrariar aquilo que está descrito na literatura, pois sabe-se que o tratamento antibacteriano altera a microbiota do TGI e a pressão selectiva exercida permite o crescimento de bactérias resistentes (Greene & Boothe, 2012; EMA, 2013; Guardabassi et al., 2004).

Para o grupo C1ca, relativamente aos potenciais factores de risco: tempo de contacto com a FMV e a sua frequência, para o aumento da quantidade de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, verificou-se que os cães que contactavam há mais tempo com a FMV tinham uma maior probabilidade de apresentar contagens bacterianas superiores ($P=0,001$).

5- Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o que tem sido descrito: está a verificar-se um aumento de animais colonizados com bactérias produtoras de β -lactamases (Wedley et al., 2011). Está descrito que actualmente as β -lactamases do tipo ESBL são mais comuns que as do tipo AmpC plasmídicas em medicina humana (Bush & Jacoby, 2009). No entanto nos animais de companhia os resultados obtidos têm sido variáveis (Hordijk et al., 2013; Belas et al., 2014). Contudo, neste trabalho as β -lactamases predominantes foram as do tipo ESBL.

Assim, como demonstrado neste trabalho, a colonização nosocomial em cães submetidos a tratamento cirúrgico e em cães que contactam com o ambiente hospitalar é uma realidade em medicina veterinária. Esta problemática apresenta uma grande importância não só devido ao impacto directo sobre os pacientes, mas também devido ao facto de as bactérias resistentes poderem ser transmitidas dos animais de companhia às pessoas. Hoje em dia, esta transmissão está facilitada pelo contacto cada vez mais próximo entre os humanos e os seus animais de companhia.

Vários factores podem favorecer a colonização nosocomial, a qual por sua vez pode conduzir à ocorrência de infecção nosocomial. Por esta razão, devem ser adoptadas condutas de controlo de colonização nosocomial e assim de prevenção de infecção nosocomial em medicina veterinária, à semelhança do que é praticado em medicina humana.

Uma vez que as infecções nosocomiais podem ter origem endógena, isto é, resultar de bactérias resistentes pertencentes ao animal, a investigação prévia de certos pacientes é essencial. Assim, devem ser investigados os animais com maior probabilidade de desenvolver uma infecção, ou seja, animais com história clínica de infecção, animais que irão ser submetidos a cirurgias mais complicadas, assim como animais imunodeprimidos. Por outro lado, a infecção nosocomial pode também ter origem exógena (ambiente hospitalar e artigos contaminados etc), o que explica a extrema importância dos cuidados de higiene ambiental. Por fim, também devem ser aplicadas condutas que limitem o contacto com animais infectados, de forma a impedir a disseminação de bactérias resistentes e que permitam o correcto uso de antibacterianos.

A extrema importância do controlo de infecções causadas por bactérias resistentes em medicina veterinária tem conduzido à elaboração de guias de controlo, entre os quais se destaca os *guidelines* de controlo de infecção da Fundação *The Bella Moss*. Esta fundação reúne um painel de veterinários reconhecidos e tem como missão educar e apoiar os médicos

veterinários e os tutores dos animais, no tratamento e na prevenção de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

6- Bibliografia

- Arias, M.V.B., Aiello, G., Battaglia, L.A. e Freitas, J.C. (2013). Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33 (6), 771-779.
- Belas, A., Salazar, A.S., Gama, L.T., Couto, N. & Pomba, C. (2014). Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamase in dogs. *Veterinary Record*, 175.
- Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, S347-S357.
- Bergstrom, A., Gustafsson, C., Leander, M., Fredriksson, M., Gronlund, U. & Trowald-Wigh, G. (2012). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococci* in surgically treated dogs and the environment in a Swedish animal hospital. *Journal of Small Animal Practice*, 53, 404-410.
- Blood, D. C. & Studdert, V. P. (2002). *Dicionário de Veterinária (2nd ed.)*. Guanabara.
- Bush, K. & Jacoby, G. A. (2010). Update functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 969-976.
- Carrer, A., Poirel, L., Eraksoy, H., Cagatay, A. A., Badur, S. & Nordmann, P. (2008). Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (8), 2950-2954.
- Centers for Disease Control and Prevention (2013). *One Health*. Acedido em Jan. 11, 2014, disponível em: <http://www.cdc.gov/onehealth/about.html>
- Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10), 4555-4558.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. CLSI M100-S24, Wayne, PA, USA.
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Coelho, A. C., Matos, M., Vinué, L., Rodrigues, J. & Torres, C. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Veterinary Microbiology*, 127, 97-105.
- D'Agata, E. M. C., Gautam, S., Green, W. K. & Tang, Y. W. (2002). High Rate of False-Negative Results of the Rectal Swab Culture Method in Detection of Gastrointestinal Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Infectious Diseases*, 34, 167-72.
- Dierikx, C.M., Duijkeren, E., Schoormans, A.H.W., Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Kant, A., Huijsdens, X.W., Zwaluw, K., Wagenaar, J.A. & Mevius, D.J. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1368-1374.

Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2013). *Plano de Ação Nacional para a Redução do Uso de Antibióticos nos Animais*. Lisboa: DGAV.

Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J. & Woodford, N. (2012). Improved Multiplex PCR Strategy for Rapid Assignment of the Four Major *Escherichia coli* Phylogenetic Groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (9), 3108–3110.

Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W. & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), 90-103.

Eberly College of Science (2014). *Prokaryotes II: Structure and Function*. Acedido em Nov. 15, 2014, disponível em: https://online.science.psu.edu/biol110_sandbox_8862/node/8971

Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I. & Stratchounski, L. (2003). Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (12), 3724–3732.

European Food Safety Authority (2013). *Carbapenem resistance in food animal ecosystems*. Itália: EFSA Journal.

European Medicines Agency (2013). *Reflection paper on the risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals*. Reino Unido: EMA.

European Medicines Agency (2014). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012: Fourth ESVAC report*. Reino Unido: EMA.

Fischer, J., Rodríguez, I., Schmoger, S., Friese, A., Roesler, U., Helmuth, R. & Guerra, B. (2012). *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Girlich, D., Bouihat, N., Poirel, L., Benouda, A. & Nordmann, P. (2013). High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase and OXA-48 carbapenemase producing Enterobacteriaceae at a University hospital in Morocco. *Clinical Microbiology and Infection*.

Greene, C. E. & and Boothe, D. M. (2012). Antibacterial Chemotherapy. In Craig E. Greene (Ed.), *Infections Diseases of the Dog and Cat* (4nd ed.). (pp. 283-191). Elsevier.

Grgurich, P., Hudcova, J., Lei, Y., Sarwar, A. & Craven, D. (2012) *Management and Prevention of Ventilator-associated Pneumonia Caused by Multidrug-resistant Pathogens: Pharmacokinetic & Pharmacodynamic Optimization of β -lactams*. Acedido em Jan. 19, 2015, disponível em: http://www.medscape.com/viewarticle/774933_5

Grosso, F. (2014). *Acinetobacter baumannii e Pseudomonas aeruginosa: epidemiologia, carbapenemases implicadas e repercussões na sua deteção*. Workshop Carbapenemases em Bacilus de Gram Negativo: Deteção e Implicações Clínicas. Porto: Faculdade de Farmácia do Porto.

Guardabassi, L., Schwarz, S. & Lloyd, H. D. (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 321–332.

- Gupta, A., Della-Latta, P., Todd, B., San Gabriel, P., Haas, J., Wu, F., Rubenstein, D. & Saiman, L. (2004). Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. *Infection Control Hospital Epidemiology Journal*, 25 (3), 210-215.
- Haenni, M., Saras, E., Métayer, V., Médaille, C. & Madec, J. Y. (2014). High prevalence of blaCTX-M-1/IncI1/ST3 and blaCMY-2/IncI1/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (9), 5358-5362.
- Hanselman, B. A., Kruth, S. & Weese, J. S. (2008). Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*, 126 (1-3), 277-281.
- Hoet, A. E., Van, B. J., Nava, H. R. C., Bateman, S., Hillier, A., Dyce, J. & Wittum, T. E. (2013). Epidemiological profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-positive dogs arriving at a veterinary teaching hospital. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13 (6), 385-393.
- Hordijk, J., Schoorman, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., Mevius, D. & Wagenaar, J.A. (2013). High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Frontiers in Microbiology*, 4 (242), 1-5.
- Kapil, R., Bhavsar, H. K. & Madan, M. (2015). Hand hygiene in reducing transient flora on the hands of healthcare workers: An educational intervention. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 33 (1), 125-128.
- Kaur, D. C. & Narayan, P. A. (2014). Mupirocin resistance in nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers of a tertiary care rural hospital. *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 18 (11), 716-721.
- Lautenbach, E., Harris, A. D., Perencevich, E. N., Nachamkin, I., Tolomeo, P. & Metlay, J. P. (2005). Test Characteristics of Perirectal and Rectal Swab Compared to Stool Sample for Detection of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Gastrointestinal Tract. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2), 798-800.
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D. F. J., Giske, C. G., Heisig, P., MacGowan, A. P., Mouton, J. W., Nordmann, P., Rodloff, A. C., Rossolini, G. M., Soussy, C. J., Steinbakk, M., Winstanley, T. G. & Kahlmeter, G. (2011). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*.
- Lerner, A., Romano, J., Chmelnitsky, I., Navon-Venezia, S., Edgar, R. & Carmelia, Y. (2013). Rectal Swabs Are Suitable for Quantifying the Carriage Load of KPC Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (3), 1474–1479.

- Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L. (2007). Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*, 121, 197–214.
- Li, B., Sun, J., Han, L., Huang, X., Fu, Q. & Ni, Y. (2010). Phylogenetic Groups and Pathogenicity Island Markers in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Asymptomatic Humans in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 6698-6700.
- Maddison, J. E., Watson, A. D. & Elliott, J. (2008). Antibacterial Drugs. In J. E. Maddison, S.W. Page & D. B. Church (Eds.), *Small Animal Clinical Pharmacology* (2nd ed.). (pp.148-168). Elsevier Limited.
- March, A., Aschbacher, R., Dhanji, H., Livermore, D. M., Bottcher, A., Sleghe, F., Maggi, S., Noale, M., Larcher, C. & Woodford, N. (2010). *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (7), 934-944.
- Martel, J. L., Tardy, F., Sanders, P. & Boisseau, J. (2001). New trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Veterinary Research*, 32, 381-392.
- Miriagou, V., Tzouvelekis, L. S., Rossiter, S., Tzelepi, E., Angulo, F. J. & Whichard, J. M. (2003). Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (4), 1297-1300.
- Moreira, C. & Mendes, D. (1998). *Universidade de Évora – Laboratório de Biologia Molecular: Vectores de Clonagem*. Acedido em Nov. 20, 2014, disponível em: <http://materiais.dbio.uevora.pt/LBM/Foco/Vectores/vectores.html>
- Nelson, L. L. (2011). Surgical Site Infections in Small Animal Surgery. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 41, 1041–1056.
- Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257,1064–1073.
- Nordberg, V., Peralta, A. Q., Galindo, T., Turlej-Rogacka, A., Iversen, A., Giske, C. G. & Navér, L. (2013). High Proportion of Intestinal Colonization with Successful Epidemic Clones of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in a Neonatal Intensive Care Unit in Ecuador. *PLOS ONE*, 8.
- Ogeer-Gyles, J., Mathews, K. A., Sears, W., Prescott, J. F., Weese, J. S. & Boerlin, P. (2006). Development of antimicrobial drug resistance in rectal *Escherichia coli* isolates from dogs hospitalized in an intensive care unit. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229 (5), 694-699.
- Oliveira, J. H. L., Granato, A. C., Hirata, D. B., Hokka, C. O. & Barboza, M. (2009). Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processo de isolamento e mecanismo de acção. *Química Nova*, 32 (8), 2142-2150.
- One Health initiative. *Mission Statement*. Acedido em Jan. 11, 2014, disponível em: <http://www.onehealthinitiative.com/mission.php>

- Osugui, L., de Castro, A. F., Iovine, R., Irino, K. & Carvalho, C. M. (2014). Virulence genotypes, antibiotic resistance and the phylogenetic background of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections of dogs and cats in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 171 (1-2), 242-247.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (4), 657-686.
- Pérez-Pérez, F. J. & Hanson, N. D. (2002). Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6), 2153–2162.
- Périchon, D. & Courvalin, P. (2009). Antibiotic Resistance. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (3rd ed.). (pp. 193-204). Elsevier.
- Perry, J. D., Naqvi, S. H., Mirza, I. A., Alizai, S. A., Hussain, A., Ghirardi, S., Orega, S., Wilkinson, K., Woodford, N., Zhang, J., Livermore, D. M., Abbasi, S. A. & Muhammad W. Raza, M. W. (2011). Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 2288-2294.
- Pitout, J.D., Sanders, C.C. & Sanders, W. E. (1997). Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *The American Journal of Medicine*. 103(1),51-59.
- Poirel, L., Héritier, C., Tolun, V. & Nordmann, P. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (1), 15-22.
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V. & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70, 119-123.
- Pomba, C., Mendonça, N., Costa, M., Louro, D., Baptista, B., Ferreira, M., Correia, J. D., Caniça, M. (2006). Improved multiplex PCR method for the rapid detection of β -lactamase genes in *Escherichia coli* of animal origin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56, 103–106.
- Pomba, C., López-Cerero, L., Bellido, M., Serrano, L., Belas, A., Couto, N., Cavaco-Silva, P., Rodríguez-Bano, J. & Pascual, A. (2013). Within-lineage variability of ST131 *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the south of Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Pomba, C., Endimiani, A., Rossano, A., Saial, D., Couto, N. & Perreten, V. (2014). First Report of OXA-23-Mediated Carbapenem Resistance in Sequence Type 2 Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii* Associated with Urinary Tract Infection in a Cat. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (2), 1267–1268.

Procter, T. D., Pearl, D. L., Finley, R. L., Leonard, E. K., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Weese, J. S., Peregrine, A. S. & Sargeant, J. M. (2014). A Cross-Sectional Study Examining the Prevalence and Risk Factors for Anti-Microbial-Resistant Generic *Escherichia coli* in Domestic Dogs that Frequent Dog Parks in Three Cities in South-Western Ontario, Canada. *Zoonoses and Public Health*, 61, 250-259.

Rashid, Z., Farzana, K., Sattar, A. & Murtaza, G. (2012) Prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospital Personnel and Associated Risk Factors. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 69 (5), 985-991.

Rodrigues, E. M. P. (2013). *Infecção de Sítio Cirúrgico em Cães e Gatos na Rotina do Bloco Cirúrgico de Hospital Veterinário Universitário em Porto Alegre, no ano de 2012*. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ruppé, E., Armand-Lefèvre, L., Estellat, C., El-Mniai, A., Boussadia, Y., Consigny, P. H., Girard, P. M., Vittecoq, D., Bouchaud, O., Pialoux, G., Esposito-Farèse, M., Coignard, B., Lucet, J. C., Andremont, A. & Matheron, S. (2014). Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/>

Sanchez, S., Stevenson, M. A. M., Hudson, C. R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q. & Maurer, J. J. (2002). Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (10), 3586-3595.

Santos, L. L., Moura, R. A., Aguilar-Ramires, P., Castro, A. P. & Lincopan, N. (2013). Current status of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in animals. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.), 1600-1607.

Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Berninghoff, E. P., Imirzalioglu, C. & Chakraborty, T. (2014). Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiology*, 14.

Shaheen, B. W., Nayak, R. & Boothe, D. M. (2013). Emergence of a New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-1)-Encoding Gene in Clinical *Escherichia coli* Isolates Recovered from Companion Animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (6), 2902-2903.

Sidjabat, H. E., Townsend, K. M., Nancy, D. H., Bell, J. M., Stokes, H. W., Gobius, K. S., Moss, S. M. & Trott, D. J. (2006). Identification of *bla*_{CMY-7} and associated plasmid-mediated resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs at a veterinary teaching hospital in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 840-848.

Smet, A., Boyen, F., Pasmans, F., Butaye, P., Martens, A., Nemec, A., Deschaght, P., Vaneechoutte, M. & Haesebrouck, F. (2012). OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 3009-3014.

Souza, A. S., Torres, J. B. & Oliveira, R. C. (2010). Identificacao laboratorial de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) em espécimes clínicos de origem hospitalar. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 42(4), 303-306.

Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Guenther, S., Bethe, A., Pfeifer, Y. & Ewers, C. (2013). Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

Tafur, J.D., Torres, J.A. & Villegas, M.V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12, 217-226.

Tamang, M. D., Nam, H., Jang, G., Kim, S., Chae, M., Jung, S., Byun, J., Park, Y. & Lim, S. (2012). Molecular Characterization of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing and Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Stray Dogs in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2705-2712.

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119, S3–S10.

The Bella Moss Foudation (2014). Practice Guidelines. Acedido em Nov. 26, 2014, disponível em: <http://www.thebellamossfoundation.com/practice-guidelines/>

Thomas, C. P., Moore, L. S. P., Elamin, N., Doumith, M., Zhang, J., Maharjan, S., Warner, M., Perry, C., Turton, J. F., Johnstone, C., Jepson, A., Duncan, N. D. C., Holmes, A. H., Livermore, D. M. & Woodford, N. (2013). Early (2008–2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 531-536.

Thomson, K.S. (2010). Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues, *Journal of Clinical Microbioogy*, 48(4), 1019-1025.

Tramuta, C., Nucera, D., Robino, P., Salvarani, S. & Nebbia, P. (2011). Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *Journal of Veterinary Science*, 12 (1), 49-55.

Valenza, G., Nickel, S., Pfeifer, Y., Eller, C., Krupa, E., Lehner-Reindl, V. & Holler, C. (2014). Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* as Intestinal Colonizers in the German Community. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (2), 1228-1230.

Villar, H. E., Baserni, M. N. & Jugo, M. B. (2013). Faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae and carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in community settings. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7 (8), 630-634.

Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., Quinn, J. P. (2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (4), 1553-55.

Wedley, A.L., Maddox, T.W., Westgarth, C., Coyne, K.P., Pinchbeck, G.L., Williams, N.J. & Dawson, S. (2011). Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. *Veterinary Record*, 168.

Woodford, N., Fagan, E. J. & Ellington, M. J. (2005). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

World Health Organization - Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (2012). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: 3rd Revision 2011*. Suíça: WHO.

World Organisation for Animal Health (2014). *OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance and OIE Standards and Activities*. France: OIE.

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K. & Tenover, F. C. (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (4), 1151-1161.

Anexo I - Actividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular no Hospital Veterinário Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, entre Fevereiro e Julho de 2014.

O estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa) entre 3 de Fevereiro de 2014 e 1 de Agosto de 2014, sob orientação da Dr^a. Ana Reisinho.

Durante este período foram desenvolvidas uma série de actividades nas seguintes áreas clínicas: Medicina Interna, Cirurgia, Imagiologia e Internamento de Pequenos Animais. Este estágio permitiu a aquisição de novos conhecimentos, a consolidação de conhecimentos adquiridos durante o curso, a aquisição de aptidões práticas e sobretudo o desenvolvimento do raciocínio científico.

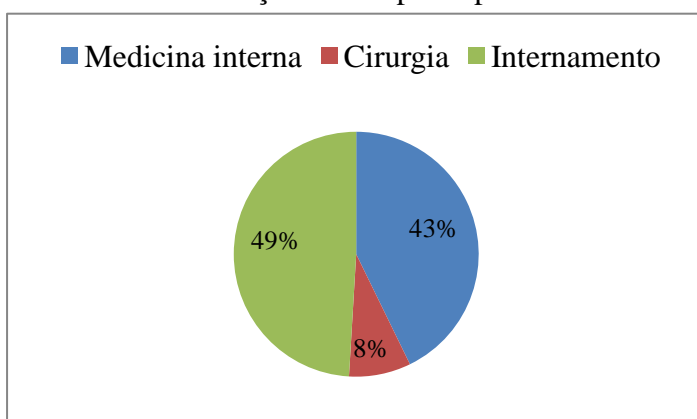
O Hospital Escolar da FMV-ULisboa oferece serviços de Medicina Interna de animais de companhia, Cirurgia, Imagiologia (exame radiológico, TAC e ecografia). Os serviços prestados são também dirigidos a animais exóticos. O Hospital está aberto 24 horas por dia e dispõe de um internamento para cães e gatos, bem como de um internamento de isolamento para casos de doenças infecto-contagiosas.

As horas despendidas em cada serviço encontram-se indicadas na Tabela 1 e Gráfico 1.

Tabela 1: Número de horas despendidas em cada serviço.

Serviço	Total de horas
Medicina Interna	544
Cirurgia	106
Internamento	624
Total	1272

Gráfico 1: Distribuição do tempo dispendido em cada serviço.



No serviço de Medicina Interna foi possível assistir a consultas assim como participar activamente na anamnese, no exame físico e em determinados procedimentos como: administração de fármacos injectáveis e vacinas, venopunção para colocação de cateteres, colheita de sangue para análise, algaliações, limpeza de feridas, execução de pensos, limpezas auriculares, observação com otoscópio, raspagens cutâneas entre outros. Quanto à casuística das consultas: na área de Dermatologia foram vistos no total 51 casos (exemplos: dermatite alérgica à picada da pulga, dermatite por lambedura, infecção por *Malassezia pachidermatis* etc); na área de Oftalmologia foram vistos no total 16 casos (exemplos: conjuntivite, síndrome de Horner, úlcera na córnea etc); na área de Oncologia foram vistos no total 22 casos (exemplos: carcinoma espinocelular, mastocitoma, neoplasia mamária etc); na área do Sistema Cardio-Respiratório foram vistos no total 23 casos (exemplos: colapso da traqueia, insuficiência cardíaca, pneumonia etc); na área do Sistema Gastro-Intestinal foram vistos no total 45 casos (exemplos: gastroenterite, lipidose hepática, parasitoses etc); na área do Sistema Nervoso foram vistos no total 33 casos (exemplos: epilepsia, hérnia discal, síndrome vestibular etc) e na área do Sistemas Reprodutor foram vistos no total 13 casos (exemplos: diagnóstico de gestação, piómetra, vaginites etc). No que diz respeito a vacinações no total foram feitas 55 e foram tratados 4 casos de reacção anafilática em canídeos, por causas diversas. Na Tabela 2 encontra-se o resumo da casuística encontrada durante o estágio.

No serviço de internamento foram prestados vários cuidados aos animais internados, tais como: administração de medicações e da alimentação, realização dos passeios, preparação das jaulas para os pacientes no pós-cirúrgico e monitorizações do estado geral. O internamento permitiu também a execução de várias técnicas, nomeadamente técnicas de contenção, venopunção para colocação de cateteres, algaliação, toracocentese, colheita de sangue para análise, execução de pensos, limpeza de feridas, enemas, fornecimento de oxigénio, administração de vários tipos de medicação, medições da pressão arterial, curvas de glicémia e fisioterapia.

No serviço de Cirurgia foi possível assistir a vários tipos de cirurgias, bem como participar activamente em algumas delas. Além disso, foi também possível executar muitas das técnicas mencionadas em cima. Houve participação na administração da medicação pré-anestésica, indução anestésica, colocação do tubo endotraqueal e monitorização da anestesia volátil. As tarefas desempenhadas variavam consoante a necessidade do cirurgião, englobando os papéis de anestesista, circulante ou ajudante de cirurgião. As cirurgias foram bastante variadas e estão descritas nas Tabelas 3 e 4.

Após a cirurgia era feito o acompanhamento e monitorização do paciente até este se encontrar estável no internamento. Foi possível participar em várias consultas de acompanhamento pós-cirúrgicas o que permitiu a realização de pensos simples, limpeza de feridas e remoção de pontos.

No âmbito da imagiologia foi possível assistir e ajudar na realização de exames radiográficos, como radiografias simples ou mielografias, TAC, assim como nos exames ecográficos (oculares, torácicos, abdominais e cardíacos).

Tabela 2: Resumo da casuística das consultas de Medicina Interna encontrada durante o estágio.

Área	Espécie	Nº de casos	Nº total de casos
Dermatologia	Canídeos	45	51
	Felídeos	5	
	Exóticos	1	
Oftalmologia	Canídeos	13	16
	Felídeos	0	
	Exóticos	3	
Oncologia	Canídeos	17	22
	Felídeos	3	
	Exóticos	2	
Sistema Cardio-Respiratório	Canídeos	17	23
	Felídeos	5	
	Exóticos	1	
Sistema Gastro-Intestinal	Canídeos	33	45
	Felídeos	11	
	Exóticos	1	
Sistema Nervoso	Canídeos	30	33
	Felídeos	3	
	Exóticos	0	
Sistema Reprodutor	Canídeos	13	13
	Felídeos	0	
	Exóticos	0	
Vacinação	Canídeos	39	55
	Felídeos	15	
	Exóticos	3	

Tabela 3: Resumo da casuística referente às intervenções cirúrgicas ortopédicas efectuadas durante o estágio curricular.

Cirurgia	Espécie	nº de casos	nº total de casos
Alteração de placa de fixação interna	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Artrodese carpo	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Hemilaminectomia L1-L3	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Resolução de luxação tibiotársica e coxofemoral	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Remoção cavilha	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Remoção de placa de fixação interna	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Remoção do processo anconeu em ambos os MA devido à não união	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Resolução fractura distal da tíbia inter-supercondilar	Canídeos	0	1
	Felídeos	1	
Resolução fractura do maléolo medial da tíbia	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Resolução fractura mandíbula e fenda do palato	Canídeos	0	1
	Felídeos	1	

Tabela 4: Resumo da casuística referente às intervenções cirúrgicas de tecidos moles efectuadas durante o estágio curricular.

Cirurgia	Espécie	nº de casos	nº total de casos
Amputação cauda	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Destartarização	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Exérese nódulos	Canídeos	7	7
	Felídeos	0	
Esplenectomia	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Extracção dentária	Canídeos	1	2
	Felídeos	1	

Laparotomia exploratória (suspeita de obstrução por CE linear)	Canídeos	0	1
	Felídeos	1	
Laparotomia exploratória com biópsias gástricas e intestinais	Canídeos	0	1
	Felídeos	1	
Mastectomia parcial	Canídeos	4	4
	Felídeos	0	
Ovariohisterectomia profilática	Canídeos	3	4
	Felídeos	1	
Orquiectomia	Canídeos	4	8
	Felídeos	4	
Ovariohisterectomia por piómetra	Canídeos	3	3
	Felídeos	0	
Remoção massa intra-oral	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	
Rinoscopia	Canídeos	1	1
	Felídeos	0	

Anexo II – Questionário feito para os cães de ambos os grupos (grupo de controlo do ambiente e grupo de cirurgia).

1. Proprietário:
Contacto:
Zona de residência:
2. Nome:
3. Raça:
4. Idade:
5. Sexo: Esterilizado? Sim Não
6. Peso:
7. Proveniência? Particular Criador Associação
8. Tem acesso à rua?
9. Vive com outros animais? Sim Não Algum deles já esteve internado? Sim Não
10. Esteve em algum canil/hotel para cães? Sim Não Há quanto tempo?
11. Já foi submetido a alguma cirurgia? Sim Não
Qual?
Há quanto tempo (a última cirurgia)?
Esteve internado quanto tempo?
12. Possui outras doenças? Sim Não
Qual(ais)?
Faz tratamento? Sim Não Qual?
13. Durante o último ano tomou algum antibacteriano? Sim Não
Qual?
Qual o motivo?
14. Esteve internado no último ano? Sim Não
Qual o motivo?
Quanto tempo?
15. Alguma das pessoas com quem vive presta serviço na área da saúde (medicina humana ou veterinária)? Sim Não
16. Há quanto tempo frequente a FMV (anos)?
17. Qual a frequência de idas à FMV?

Anexo III – Questionário feito apenas para os cães do grupo de cirurgia.

1. Dia de recolha da 2ª amostra fecal.
2. Tipo de cirurgia: Tecidos moles Ortopédica
3. Qual a intervenção cirúrgica realizada?
4. Foi uma cirurgia electiva? Sim Não
5. Tempo de internamento até ser realizada a recolha da 2ª amostra fecal (dias):
6. Tempo total de internamento (dias):
7. Qual a antibioterapia?
8. Tempo de antibioterapia até ser realizada a recolha da 2ª amostra fecal (dias):
9. Tempo total de antibioterapia (dias):
10. Altura da antibioterapia: Peri-cirúrgico Pré-cirúrgico Pós-cirúrgico

Anexo IV – Respostas ao questionário feito para os cães de ambos os grupos, relativas aos cães pertencentes ao grupo de controlo do ambiente.

Id	Proprietário (particular ou canil)	Zona de residência	Raça	Idade (anos)	Sexo	Proveniência	Acesso à rua	Outros animais	Canil/hotel
JS1	Particular	Oeiras	SRD	5	F	Associação	s	s	N
JS2	Particular	Oeiras	SRD	3	F	Associação	s	s	N
JS3	Particular	Oeiras	Teckel	1,4	M	Particular	s	s	N
JS4	Canil	.	SRD	14	FC	.	s	s	S
JS5	Particular	Odivelas	Pit Bull Terrier	5	FC	Particular	s	n	N
JS6	Particular	Lisboa	SRD	7	FC	Particular	s	n	N
JS7	Particular	Seixal	SRD	4	MC	Associação	s	n	N
JS8	Particular	Benfica	Leão da Rodézia	2	FC	Criador	s	n	S
JS9	Particular	Oeiras	Jack Russel	0,5	F	Particular	s	n	N
JS10	Particular	Lisboa	West Highland White Terrier	1,7	M	Particular	s	n	N
JS11	Particular	Amadora	Teckel	1,4	M	Particular	s	n	N
JS12	Particular	Lisboa	Springer Spaniel	10	M	Criador	s	n	S
JS13	Particular	Lisboa	Teckel	1,5	F	Particular	s	n	N
JS14	Particular	Queluz	Yorkshire Terrier	4	FC	Particular	s	n	N
JS15	Particular	Amadora	SRD	8	FC	Associação	s	n	N
JS16	Particular	Cascais	Braco Alemão	2	F	Particular	s	n	N
JS17	Particular	Évora	Podengo Português	11	MC	Particular	s	s	N
JS18	Particular	Évora	Epagneul Breton	16,5	FC	Criador	s	s	s
JS19	Canil	.	SRD	14	MC	.	s	s	s
JS20	Canil	.	SRD	15	M	.	s	s	s
JS21	Canil	.	SRD	6	M	.	s	s	s
JS22	Canil	.	SRD	12	M	.	s	s	s
JS23	Particular	Moita	SRD	1,5	FC	Associação	s	s	n
JS24	Canil	.	SRD	14	MC	Particular	s	s	s
JS25	Canil	.	SRD	1,6	F	.	s	s	s
JS26	Canil	.	SRD	2	MC	.	s	s	s
JS27	Particular	Lisboa	Bulldog Inglês	10	MC	Particular	s	s	n
JS28	Canil	.	SRD	1,7	100FC	.	s	s	s

JS29	Canil	.	SRD	12	M	.	s	s	s
JS30	Canil	.	SRD	8	M	.	s	s	s
JS31	Canil	.	SRD	12	F	.	s	s	s
JS32	Canil	.	SRD	8	FC	.	s	s	s
JS33	Particular	Cascais	SRD	8	MC	Particular	s	n	n
JS34	Particular	Lisboa/ Nisa	Teckel	8	M	Criador	s	s	n
JS35	Particular	Peniche	SRD	2	F	Particular	s	s	n
JS36	Canil	.	SRD	16	F	.	s	s	s
JS37	Particular	Lisboa	SRD	0,7	M	Particular	s	n	n
JS38	Particular	Belém	Podengo Português	3	FC	Criador	s	s	n
JS39	Particular	Benfica	Golden Retriever	8	M	Criador	s	n	n
JS40	Particular	Lisboa	Bull Terrier	2	MC	Particular	s	n	s
JS41	Particular	Lisboa	SRD	8	F	Associação	s	s	n
JS42	Particular	Lisboa	SRD	10	M	Particular	s	s	n
JS43	Particular	Amadora	Cocker Spaniel	2	M	Criador	s	n	n

Id	Outras doenças	Ab no último ano	Internado no último ano	Submetido a cirurgia	Proprietários com contacto com a área da saúde	Tempo de contacto com a FMV (anos)	Frequência de idas à FMV
JS1	s	n	n	n	s	.	.
JS2	n	n	n	s	s	.	.
JS3	n	n	n	n	s	1,5	diariamente
JS4	s	n	n	.	s	4	diariamente
JS5	s	n	n	s	s	3	diariamente
JS6	n	n	n	s	s	2	diariamente
JS7	n	s	s	s	s	0,4	diariamente
JS8	n	s	s	s	s	1,7	diariamente
JS9	s	n	n	n	s	0,2	diariamente
JS10	n	n	n	n	s	1,5	diariamente
JS11	n	n	n	n	s	0,2	diariamente
JS12	n	n	n	n	s	10	diariamente
JS13	n	n	n	n	s	1	1 vez/mês
JS14	n	s	s	s	s	3,5	3vezes/ semana
JS15	n	n	n	s	s	.	.
JS16	n	n	n	n	s	1,5	2 em 2 meses
JS17	n	s	s	s	s	0,3	diariamente

JS18	s	s	s	s	s	0,3	Diariamente
JS19	n	s	n	s	s	3	diariamente
JS20	s	n	n	s	s	5	diariamente
JS21	n	s	s	s	s	2	diariamente
JS22	n	s	n	.	s	5	diariamente
JS23	n	s	s	s	s	1	diariamente
JS24	s	s	s	s	s	7	diariamente
JS25	n	s	s	n	s	0,1	diariamente
JS26	n	s	s	s	s	1	diariamente
JS27	s	n	n	s	s	6	diariamente
JS28	n	s	s	s	s	0,1	diariamente
JS29	n	n	n	.	s	5	diariamente
JS30	n	n	n	.	s	5	diariamente
JS31	n	n	n	.	s	5	diariamente
JS32	n	n	n	s	s	5	diariamente
JS33	n	s	n	s	s	.	.
JS34	n	n	n	s	s	2	15 dias/mês
JS35	n	s	n	n	s	.	.
JS36	n	n	n	.	s	6	diariamente
JS37	n	s	s	n	s	0,3	2vezes/mês
JS38	s	s	n	s	s	2	1vez/mês
JS39	s	s	n	n	s	6	diariamente
JS40	n	s	s	s	s	2	diariamente
JS41	s	n	n	.	s	.	.
JS42	s	n	n	.	s	.	.
JS43	s	n	n	n	s	.	.

Anexo V – Respostas ao questionário feito para os cães de ambos os grupos, relativas aos cães pertencentes ao grupo de cirurgia.

Id	Proprietário (Particular ou canil)	Zona de residência	Raça	Idade (anos)	Sexo	Proveniência	Acesso à rua	Outros animais	Canil/hotel
JC1	Particular	Amadora	SRD	0,9	M	Particular	s	s	n
JC2	Particular	Moita	SRD	11	F	Particular	s	n	s
JC3	Particular	Amadora	Caniche	8	M	Canil	s	s	s
JC4	Particular	Lisboa	SRD	7	FC	.	s	s	n
JC5	Particular	Campolide	Fila de S.Miguel	0,6	M	Criador	s	n	n
JC6	Particular	Lisboa	SRD	10	M	Criador	s	s	n
JC7	Particular	Amadora	Cocker Spaniel	2,5	M	Criador	s	n	n
JC8	Particular	Almada	Grand Danois	0,6	F	Particular	s	s	n
JC9	Particular	Almada	SRD	5	MC	Associação	s	s	n
JC10	Particular	Algueirão	Yorkshire Terrier	12	FC	.	s	s	n
JC11	Particular	Carregado	Labrador Retriever	10,5	M	Criador	s	s	n
JC12	Particular	Cacém	SRD	10,7	FC	Criador	s	n	n
JC13	Particular	Oeiras	Pit Bull Terrier	10,6	MC	Criador	s	n	n
JC14	Particular	Lisboa	Weimaraner	6	MC	Particular	s	n	n
JC15	Particular	Oeiras	American Stadfordshire Terrier	7	M	Criador	s	s	n
JC16	Particular	Sintra	SRD	13	F	Associação	s	n	n
JC17	Particular	Lisboa	Fox Terrier	10	M	Associação	s	n	n
JC18	Particular	Lisboa	SRD	2	M	Criador	s	s	n
JC19	Particular	Oeiras	SRD	3	F	Associação	s	s	n
JC20	Particular	Oeiras	SRD	12	MC	Particular	s	s	n
JC21	Particular	Venda do Pinheiro	Caniche	10,5	M	Associação	s	s	n
JC22	Particular	Amadora	W.H.W. Terrier	12	M	Criador	s	n	s
JC23	Particular	Cascais	SRD	0,7	F	Particular	s	s	n
JC24	Particular	Oeiras	SRD	0,2	M	Associação	s	s	n
JC25	Particular	Oeiras	SRD	5	F	Associação	S	s	n

Id	Outras doenças	Ab no último ano	Internado no último ano	Submetido a cirurgia	Proprietários com contacto com a área da saúde
JC1	N	s	s	n	N
JC2	S	s	s	s	N
JC3	N	n	n	.	N
JC4	S	n	n	s	N

JC5	N	n	n	n	N
JC6	S	s	s	s	N
JC7	s	n	n	n	S
JC8	n	s	n	n	N
JC9	s	s	s	s	S
JC10	s	s	n	s	N
JC11	n	n	n	s	N
JC12	s	s	s	s	N
JC13	s	s	n	s	S
JC14	.	s	s	.	N
JC15	n	s	n	n	S
JC16	n	s	s	s	N
JC17	n	s	n	n	N
JC18	n	s	s	n	S
JC19	n	n	n	s	S
JC20	s	s	s	s	S
JC21	s	n	n	n	N
JC22	s	n	n	s	N
JC23	n	n	n	n	N
JC24	n	s	n	n	N
JC25	s	n	n	n	S

Anexo VI – Respostas ao questionário feito apenas para os cães do grupo de cirurgia.

Id	Dia de recolha da amostra C2	Tipo de cirurgia	Intervenção cirúrgica	Electiva ?	Tempo de interna\ até C2 (dias)	Tempo total de interna\ (dias)
JC1	9	T. Moles	Orquiectomia	sim	<1	<1
JC2	3	T. Moles	Mastectomia unilateral total	não	<1	<1
JC3	4	Ortopédica	Ventral slot	não	4	5
JC4	9	T. Moles	Exérese lipoma	sim	<1	<1
JC5	2	T. Moles	Orquiectomia	sim	<1	<1
JC6	2	Ortopédica	Luxação rótula	não	1	1
JC7	2	T. Moles	Orquiectomia	sim	<1	<1
JC8	3	Ortopédica	Hemilaminectomia	não	3	5
JC9	3	T. Moles	Amputação MAD	não	2	2
JC10	.	Ortopédica	Receção cabeça do fémur	não	.	.
JC11	2	T. Moles	Exérese nódulo gland.hepatoides e orquiectomia	não	<1	<1
JC12	3	T. Moles	Remoção massa pavilhão auricular	não	1	1
JC13	3	T. Moles	Esplenectomia e exérese de nódulos	não	3	4
JC14	.	T. Moles	Biópsia ID e cólon	não	.	.
JC15	6	T. Moles	Remoção massa MP	não	<1	<1
JC16	4	T. Moles	Mastectomia unilateral e exérese de nódulos	não	<1	<1
JC17	4	T. Moles	Exérese nódulo coxa e destartarização	não	<1	<1
JC18	3	T. Moles	Orquiectomia	sim	<1	<1
JC19	4	T. Moles	OVH	sim	<1	<1
JC20	5	Ortopédica	TTA	não	2	2
JC21	3	T. Moles	Exérese nódulo gland.hepatoides, orquiectomia e destartarização	não	<1	<1
JC22	2	T. Moles	Exérese nódulo cutâneo	sim	<1	<1
JC23	.	T. Moles	OVH	sim	.	.
JC24	2	Ortopédica	Osteossíntese fémur esquerdo	não	<1	<1
JC25	2	T. Moles	OVH	sim	<1	<1

Id	Ab	Tempo de ab até C2 (dias)	Tempo total de ab (dias)	Altura da ab
JC1	AMC	7	7	Poscx
JC2	AMC	3	10	precx e poscx
JC3	2CG	4	5	precx e poscx
JC4	AMC	7	7	precx e poscx
JC5	AMC	2	8	Poscx
JC6	AMC	2	7	Poscx
JC7	AMC	2	8	Poscx
JC8	AMC	3	15	precx e poscx
JC9	AMC	3	7	Poscx
JC10
JC11	AMC	2	8	precx e poscx
JC12	AMC	3	10	precx e poscx
JC13	AMC	3	8	precx e poscx
JC14
JC15	3CG e Metronidazol	6	10	Poscx
JC16	AMC	4	8	precx e poscx
JC17	Metronidazol e Macróido	4	13	Pericx, precx e poscx
JC18	AMC	3	7	precx e poscx
JC19	AMC	4	8	precx e poscx
JC20	AMC e 2CG	5	12	Poscx
JC21	AMC e Metronidazol	3	8	precx e poscx
JC22	AMC	2	5	precx e poscx
JC23
JC24	AMC	2	18	Pericx, precx e poscx
JC25	AMC	2	8	precx e poscx

Anexo VII – Resultados dos testes de susceptibilidade a antibacterianos das estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e aos carbapenemos isoladas no grupo de controlo do ambiente.

Tabela 1: Resultados dos testes de susceptibilidade a antibacterianos das estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração isoladas no grupo de controlo do ambiente.

Código estirpe	AMP (10)	AMC (30)	KF (30)	FOX (30)	CTX (30)	CAZ (30)
JS4 ctx	R	I	R	S	R	R
JS8a ctx	R	R	R	R	R	R
JS8b ctx	R	R	R	R	R	R
JS11 ctx	R	R	R	R	R	S
JS12 ctx	R	R	R	R	R	S
JS16a ctx	R	R	R	R	R	S
JS16b ctx	R	I	R	S	R	S
JS17 ctx	R	R	R	R	R	R
JS18 ctx	R	R	R	R	R	R
JS19 ctx	R	R	R	R	R	R
JS20 ctx	R	R	R	R	R	R
JS21 ctx	R	R	R	R	R	R
JS24 ctx	R	R	R	R	R	R
JS25 ctx	R	R	R	R	R	R
JS26 ctx	R	R	R	R	R	R
JS33 ctx	R	R	R	R	R	R
JS35 ctx	R	R	R	R	R	S
JS36 ctx	R	R	R	R	R	R
JS38 ctx	R	R	R	R	R	R
JS40 ctx	R	R	R	R	R	R

Tabela 2: Resultados dos testes de susceptibilidade a antibacterianos das estirpes resistentes aos carbapenemos isoladas no grupo de controlo do ambiente.

Código estirpe	AMP (10)	AMC (30)	KF (30)	FOX (30)	CTX (30)	CAZ (30)	IPM (10)	ETP (10)	MEM (10)	ATM (30)	TZP (110)
JS23 mem	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	S

Anexo VIII – Resultado do testes de susceptibilidade a antibacterianos da estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração e aos carbapenemos isoladas no grupo de cirurgia.

Tabela 1: Resultados dos testes de susceptibilidade a antibacterianos das estirpes resistentes às cefalosporinas de 3ª geração isoladas no grupo de cirurgia.

Código estirpe	AMP (10)	AMC (30)	KF (30)	FOX (30)	CTX (30)	CAZ (30)
JC1 C1 ctx	R	S	R	S	R	S
JC1 C2 ctx	R	R	R	S	R	R
JC2 C1 ctx	R	R	R	R	R	R
JC2 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC3 1 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC3 2 C2 ctx	R	R	R	S	R	R
JC3 3 tipo 1 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC3 3 tipo 2 C2 ctx	R	R	R	S	R	I
JC4 C1 ctx	Nada a assinalar					
JC4 C2 ctx	R	R	R	R	R	S
JC6 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC7 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC8 1 C2 ctx	Nada a assinalar					
JC8 2 C2 ctx	Nada a assinalar					
JC9 C2 ctx	R	S	R	S	R	S
JC11 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC12 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC13 C2 ctx	R	S	R	S	R	R
JC14 C1 ctx	R	S	R	S	R	R
JC15 C2 ctx	Nada a assinalar					
JC16 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC17 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC18 C1 ctx	R	R	R	R	R	R
JC20 C1 ctx	R	R	R	R	R	S
JC21 C2 ctx	R	R	R	R	R	R
JC25 1 C2 ctx	R	S	R	S	R	S
JC25 2 C2 ctx	Nada a assinalar					

Tabela 2: Resultados dos testes de susceptibilidade a antibacterianos das estirpes resistentes aos carbapenemos isoladas no grupo de cirurgia.

Código estirpe	AMP (10)	AMC (30)	KF (30)	FOX (30)	CTX (30)	CAZ (30)	IPM (10)	ETP (10)	MEM (10)	ATM (30)	TZP (110)
JC4 C1 mem	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S
JC4 C2 mem	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R
JC8 1 C2 mem	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	S
JC8 2 C2 mem	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
JC15 C2 mem	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S
JC21 C2 mem	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
JC25 C2 mem	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R

Anexo IX – Gráficos complementares

Gráfico 1 - Classificação das bactérias de Gram negativo resistentes às cefalosporinas de 3ª geração.

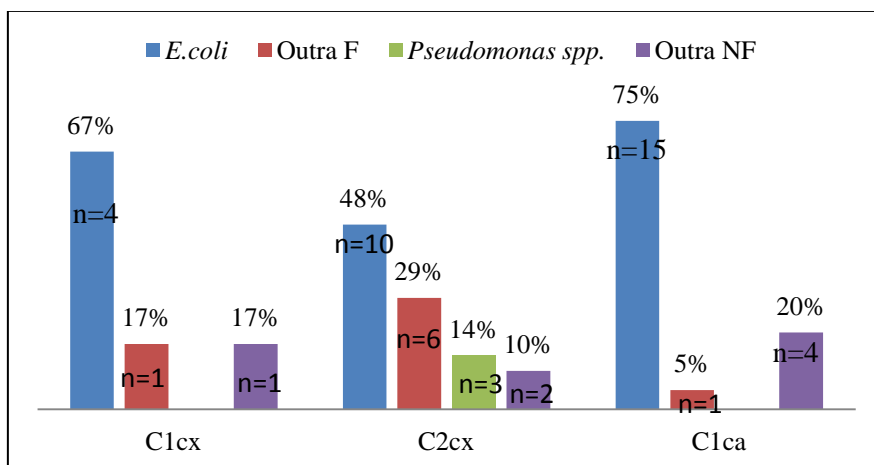


Gráfico 2 - Classificação filogenética das bactérias *Escherichia coli* resistentes às cefalosporinas de 3ª geração.

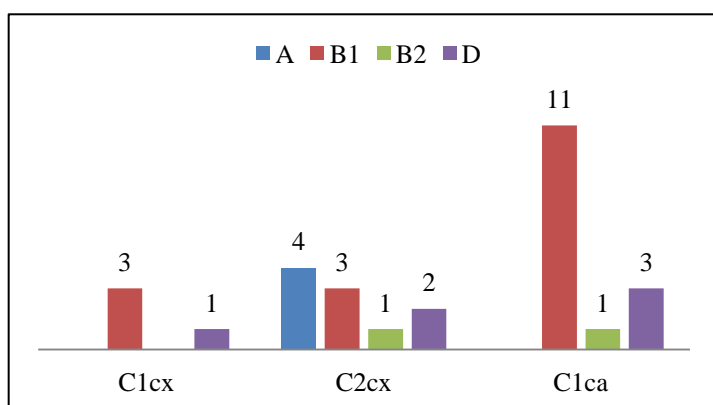


Gráfico 3 - Quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima) no grupo de cirurgia antes da cirurgia (C1cx, 6 cães colonizados em 25).

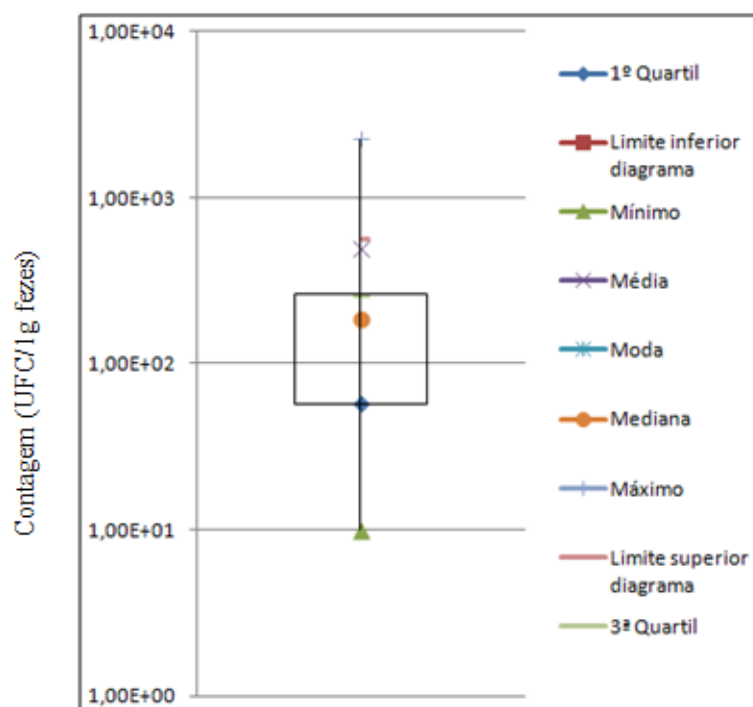


Gráfico 4 - Quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima) no grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx, 16 cães colonizados em 22).

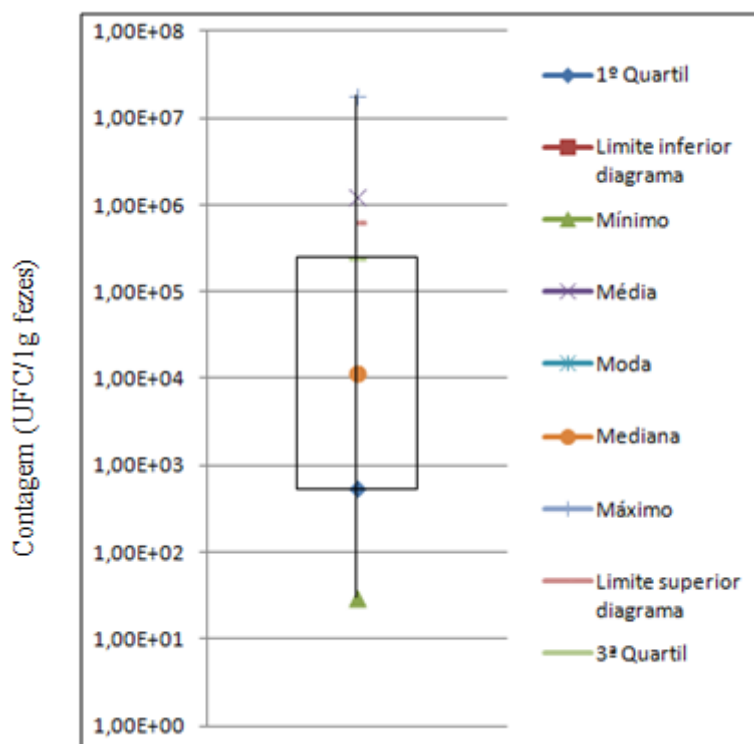


Gráfico 5 - Quantificação de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima) no grupo de controlo do ambiente (C1ca, 18 cães colonizados em 43).

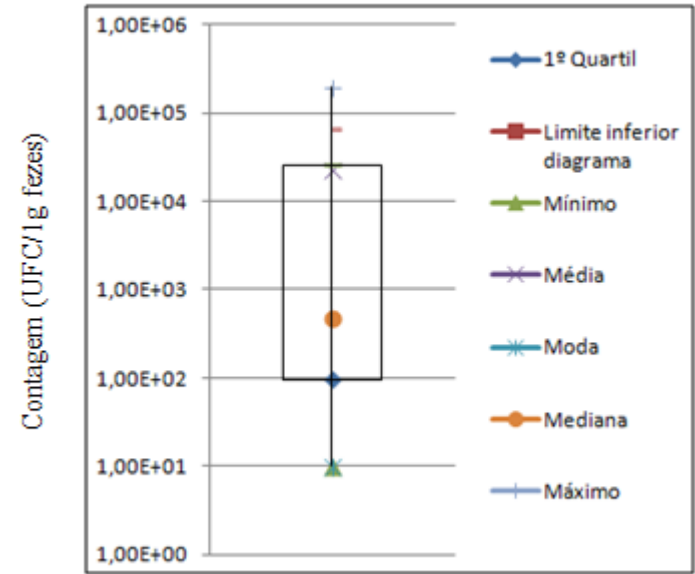


Gráfico 6 - Quantificação de bactérias resistentes aos carbapenemos (meropenem) no grupo de cirurgia após a cirurgia (C2cx, 5 cães colonizados em 22).

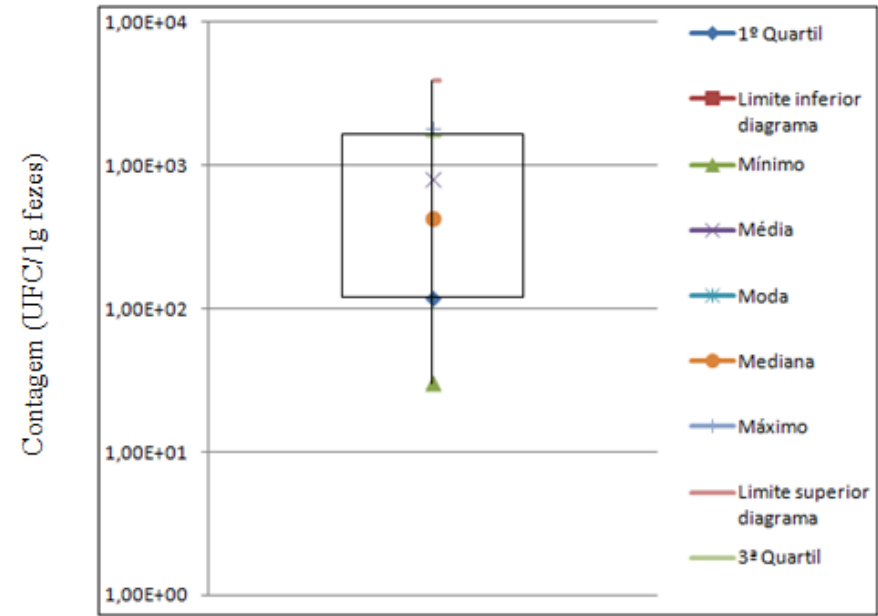


Tabela 1 - Perfis de resistência aos antibióticos β -lactâmicos observados nos isolados de *Escherichia coli* e de outras bactérias fermentadoras pelo método de difusão de discos.

Grupo	Perfis de resistência	Nº de isolados
C1cx	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	2
	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	1
	AMP, KF, CTX, CAZ	1
	AMP, KF, CTX	1
C2cx	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	9
	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ	2
	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	1
	AMP, AMC, KF, CTX	1
	AMP, KF, CTX, CAZ	1
	AMP, KF, CTX	2
C1ca	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	14
	AMP, KF, CTX, CAZ	1
	AMP, KF, CTX	1

Tabela 2 - Amostras positivas ao PCR CTX-M, a sua classificação e perfis de resistência associados.

Grupo	Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência
C1cx	JC1 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX
C2cx	JC1 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ
	JC3 2 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ
	JC3 3 tipo1 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ
	JC3 3 tipo2 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX
	JC9 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX
	JC25 1 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX
C1ca	JS4 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX, CAZ
	JS16b ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX
	JS38 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ

Legenda: F – Bactéria fermentadora

Tabela 3 - Resultados de PCR *multiplex* β -lactamases com os perfis de resistência associados e a produção simultânea do gene *bla*_{CTX-M}.

Grupo	Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência	Genes detectados
C1cx	JC2 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JC18 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JC14 C1 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{SHV}
C2cx	JC1 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
	JC2 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JC3 1 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JC3 2 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
	JC3 3 tipo1 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}
	JC3 3 tipo2 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
	JC7 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JC11 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{OXA-1}
	JC16 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JC17 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JC13 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{SHV}
C1ca	JS4 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, KF, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}
	JS8a ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS8b ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS19 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS20 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS24 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS25 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS26 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS33 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	JS36 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}

Legenda: F – Bactéria fermentadora

Tabela 4 - Resultados de PCR *multiplex* AmpC com os perfis de resistência associados e a produção simultânea do gene *bla*_{TEM}.

Grupo	Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência	Genes detectados
C1ca	JS8a ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{TEM}
	JS8b ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{TEM}

Tabela 5 - Isolados de bactérias resistentes às cefalosporinas de 3ª geração sem genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos detectados, a sua classificação e os perfis de resistência.

Grupo	Código da amostra	Classificação	Perfil de Resistências	Sinergia positiva	Genes detectados
C1cx	JC4 C1 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
	JC20 C1 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	Não	N/E
C2cx	JC4 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	Não	N/E
	JC6 C2 ctx	outra NF	CAZ	Não	N/E
	JC8 1 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	Não	N/E
	JC8 2 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	Não	N/E
	JC12 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JC15 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	Não	N/E
	JC21 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JC25 2 C2 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
C1ca	JS11 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
	JS12 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
	JS16a ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
	JS17 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JS18 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JS21 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
	JS35 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
	JS40 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E

Legenda: F – Bactéria fermentadora, NF – Bactéria não fermentadora, N/A – nada a assinalar, N/E - nenhum

Tabela 6 – Estirpes sem genes detectados, a sua classificação e o perfil de resistência.

Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência	Sinergia Positiva	Genes detectados
JC4 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX	Não	N/E
JC6 C2 ctx	outra NF	CAZ	Não	N/E
JC8 1 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	Não	N/E
JC8 2 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	Não	N/E
JC12 C2 ctx	outra F	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
JC15 C2 ctx	<i>Pseudomonas</i> spp.	N/A	Não	N/E
JC21 C2 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
JC25 2 C2 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E

Legenda: F – Bactéria fermentadora, NF – Bactéria não fermentadora, N/A – nada a assinalar, N/E – nenhum

Tabela 7 – Estirpes isoladas do grupo C1ca sem genes de resistência detectados.

Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência	Sinergia Positiva	Genes detectados
JS11 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
JS12 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
JS16a ctx	outra NF	N/A	Não	N/E
JS35 ctx	outra NF	N/A	Não	N/E

Legenda: NF – Bactéria não fermentadora, N/A – nada a assinalar, N/E - nenhum

Tabela 8 – Estirpes isoladas nas quais não foi identificado o mecanismo de resistência.

Grupo	Código da amostra	Identificação	Perfil de Resistência	Sinergia positiva	Genes detectados
C1cx	JC4 C1 mem	<i>Ralstonia picchetti</i>	ATM	Não	N/E
C2cx	JC4 C2 mem	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CAZ, ETP, ATM, TZP	Não	N/E
	JC21 C2 mem	<i>Pseudomonas putida</i>	N/A	Não	N/E
	JC25 C2 mem	N/I	ATM, TZP	Não	N/E
C1ca	JS23 mem	<i>Burkholderia cepacia</i>	N/A	Não	<i>bla</i> _{CTX-M}

Legenda: N/I – não identificado, N/A – nada a assinalar, N/E - nenhum

Tabela 9 - Estirpes da espécie *E. coli* isoladas do grupo C1ca com a capacidade de hidrolizar todos os antibióticos β -lactâmicos testados.

Código da amostra	Classificação	Perfil de resistência	Sinergia Positiva	Genes detectados
JS19 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
JS20 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
JS19 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
JS20 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
JS19 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
JS20 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
JS36 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	<i>bla</i> _{TEM}
JS17 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
JS18 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
JS21 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E
JS40 ctx	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, KF, FOX, CTX, CAZ	Não	N/E

Legenda: N/E - nenhum